

# Nanopóry jako moderní nástroj pro DNA sekvenování

Jiří Kudr<sup>a</sup>, Branislav Ruttkay-Nedecký<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

## Nanopores as a modern tool for DNA sequencing

A nanopore-based devices are extremely sensitive analytical techniques, which uses the electrophoretic translocation of molecules in solution through a nano-scale pores. The nanopores, which mimic the functions of natural ion channels, seems to be the promising tool for future fast and low-cost DNA sequencing. However, some difficulties in generating usable sequence data have to be solved. In this article the nanopores were reviewed. In the first part the development of nanopore technique was described and the ubiquitous presence of nanopores in living cells was highlighted. Next, the most important part of the principles of nanopore analysis was described, and the knowledges about biological and solid-state nanopores were summarized. Also the pros and cons of both kinds of nanopores and different approaches designed to circumvent the issues were mentioned.

**Přijato k publikování:** 14. 5. 2014

**Klíčová slova:** DNA sekvenování; hemolysin; lipidy; nanopóry;

## Úvod

Iontové kanály selektivně regulující transport biomolekul, iontů, protonů i elektronů jsou nezbytné pro téměř všechny buněčné procesy. Tyto procesy se staly inspirací pro moderní a rychle se rozvíjející obor nanopórových analýz. Elektroforetická translokace analytu přes pór o rozměrech v řádu nanometrů (nanopór) a kontinuální měření změn elektrického proudu procházejícího nanopórem v důsledku průchodu analyzovaných molekul je využívána k analýzám proteinů i syntetických nanomateriálů. Hlavním směrem vývoje současných nanopórových technologií je sekvenování DNA. Nanopóry, které by bez potřeby amplifikace a značení umožnily po izolaci levně a rychle sekvenovat dlouhé úseky DNA jsou objektem velkého zájmu a výzvou pro současnou vědu.

## Vznik techniky

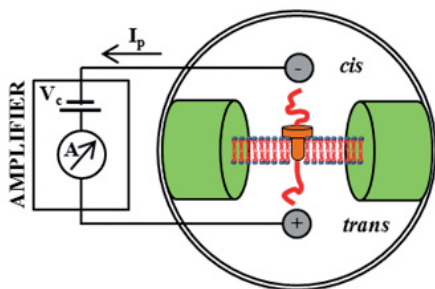
Na konci 40. let použil Wallace H. Coulter cellofán z krabičky od cigaret perforovaný horkou jehlou k tvorbě přístroje schopného počítat buňky<sup>1</sup>. Coulterův čítač, pracující na principu detekce odporových pulsů, se později stal

základním nástrojem hematologie. Snížení rozměru perforace do sub-mikrometrových jednotek na konci 70. let umožnilo stejným způsobem detekovat i několika nanometrové částice virů<sup>2</sup>. Ačkoliv se obecně předpokládá, že mechanismus použitý v Coulterově čítači byl inspirací pro nanopórové technologie a ačkoliv princip jeho fungování je stejný<sup>3</sup>, ve skutečnosti jí byly čistě biologické procesy. Transmembránové póry o rozměrech několika nanometrů (nanopóry) se nachází v každé živé buňce. Patří k nim například draslíkové kanály hERG, které selektivně propouští ionty do buněk a udržují tak v normálu elektrickou aktivitu v srdečních myocytech<sup>4</sup>. Komplexy jaderných pórů (nuclear pore complex) zajišťují přenos proteinů a nukleových kyselin mezi cytosolem a jádrem<sup>5</sup>. Proteiny tvořící nanopór u bakteriofága phi29 spojují kapsidu a krček<sup>6</sup>. Virová nukleová kyselina tímto útvarem (tzv. portal vertexem) prochází do prokapsidy při maturaci viru i opouští virus při infekci buňky. Zatímco většina uvedených transportních mechanismů je závislá na napětí a způsobuje tedy pouze dočasnou průchodnost nanopórů,

bakterie produkují toxiny schopné tvořit trvale průchodné póry v lipidových membránách<sup>7</sup>. S vědomím ubikvitní přítomnosti proteinových nanopórů a jejich funkcí v buňkách předpokládali David W. Deamer (University of California) a George Church (Harvard University), že pokud by byla molekula DNA nebo RNA elektroforeticky protáhnutá pórem vhodného průměru, mohly by jednotlivé nukleobáze modulovat proud procházející pórem<sup>8</sup>. Využití nanopórů v oblasti DNA sekvenování bylo patentováno v roce 1998<sup>9</sup>.

## Princip fungování

Měření proudu iontů procházejících kanály v biomembránách nebo v umělých lipidových vrstvách je dnes v neurobiologii a biofyzice běžnou praxí<sup>10,11</sup>. Ať již proteinový nanopór (biopór) vložený v lipidové membráně nebo nanopór uměle vytvořený v pevném, elektricky izolačním materiálu odděluje dvě komory vyplněné elektrolytem. Aplikace napětí mezi komory způsobí průchod iontů elektrolytu pórem. V případě otevřeného a neblokovaného nanopóru je detekován konstantní stejnosměrný proud, který je použit jako reference. V případě přítomnosti elektricky nabitého analytu v elektrolytu je analyt přitahován k elektrodě o opačném náboji, než je celkový náboj molekuly. Nukleové kyseliny, záporně nabitě vzhledem k přítomnosti fosforečnanu, jsou přitahovány ke kladné elektrodě (anodě).



**Obr. 1:** Ilustrační schéma aparatury využívané k analýzám nukleových kyselin (A). Zesilovač aplikuje napětí  $V_c$  a detekuje změny proudu procházejícího hemolysinem  $I_p$ . Při aplikaci napětí 120 mV a použití 1M KCl jako elektrolytu prochází hemolysinem 120 pA referenční proud, který je při translokaci ssDNA snížen na 15 pA (B).

Průchod nukleové kyseliny nanopórem z cis na trans stranu membrány způsobuje vždy alespoň částečné rozvinutí její terciální struktury. Vstup, výstup a průchod jednotlivých molekul analytu nanopórem způsobuje pokles počtu iontů procházejících pórem, tedy celkového proudu procházejícího aparaturou oproti referenčnímu proudu a je kontinuálně detekován jako soubor odporových pulzů. Změny procházejícího elektrického proudu (doba průchodu analytu nanopórem  $t_d$  a průměrná amplituda odporového pulzu  $\delta I$ ) pak naznačují fyzikálně chemické vlastnosti procházející molekuly jako je její konformace, struktura a náboj. Naopak frekvence snižování procházejícího proudu (doba mezi vznikem dvou odporových pulzů  $\delta t$ ) signalizuje koncentraci analytu. Tyto změny jsou detekovány citlivým zesilovačem běžně užívaným v patch-clamp technikách (**Obr. 1**). Průměr póru musí umožňovat průchod analytu (průměr dsDNA  $\sim 2$  nm) a současně i dostatečného množství iontů elektrolytu, jejichž průchod je snižován průřezem analyzované molekuly. Nejmenší ionty jsou schopny rozlišit struktury analytu lišící se velikostí jejich hydrodynamického poloměru ( $\sim 0.14$  nm pro  $K^+$  a  $Cl^-$ )<sup>3</sup>. Proto jsou na nanopórech založené techniky schopné detekovat i velice drobné rozdíly v polynukleotidovém řetězci, jako je například methylace CpG oblastí DNA<sup>12</sup>. Samotné fyzikální principy průchodu nukleových kyselin pórem nejsou i přes velký zájem vědecké komunity dostatečně objasněny. Pravděpodobným důvodem je komplikovanost samotného procesu. Některé práce naznačují, že samotná translokace se skládá ze dvou úseků, během kterých probíhá translokace v nepatrně odlišných rychlostech<sup>13</sup>. Vliv na rychlost translokace má i samotné složení polymeru<sup>14</sup>.

## Rozdělení nanopórů

### Biopóry

Biologické póry vložené do lipidových membrán mají oproti solid-state nanopórům několik výhod. Především se jedná o dokonale jednotnou proteinovou strukturu, která je díky rentgenové krystalografii známá až rozlišení jednotek angströmů. Biologických nanopórů je navíc celá řada a jejich již tak heterogen-

ní vlastnosti mohou být cílenou mutagenézí upravovány<sup>15</sup>.

Objektem zájmu Johna Kasianowicze byl na počátku 90. let  $\alpha$ -hemolysin<sup>16,17</sup>. Jedná se o vodorozpustný protein (33 kDa) izolovaný z bakterie *Staphylococcus aureus*. Tento protein je schopen samovolně oligomerizovat v lipidových membránách a tvořit v nich heptamerní kanál. Důsledkem vzniku kanálu v membráně je ztráta osmotického tlaku v buňce a její lýza. Tento kanál je průchodný v neutrálním pH i při vysoké iontové síle roztoku a při potenciálu 120 mV na membráně jedním hemolysinovým kanálem prochází proud 120 pA<sup>18</sup>. Předpokládalo se, že tento proud odpovídá průchodu širokému 2 nm, což potvrdil detailní popis struktury heptamerního hemolysinu<sup>19</sup>. Nejdůležitějším místem v struktuře oligomerizovaného hemolysinu je konstriktce v místě přechodu vestibulu v  $\beta$ -barelu, v kterém je vnitřní kanálek široký 1.4 nm. Kasianowicz poprvé demonstroval elektroforetický transport ssDNA a ssRNA hemolysinem v roce 1996<sup>18</sup>. Detekované rozdíly v translokaci mezi RNA homopolymery (polyadenylovou a polycytidylovou kyselinou) a DNA homopolymery (polydeoxyadenylovou a polydeoxycytidylovou kyselinou) potvrdily potenciální možnost využít hemolysin jako součást sekvenovacích metod nové generace<sup>20,21</sup>. V současné době se ukazuje, že hemolysin není vhodným nástrojem pro sekvenování DNA a v současné době je spíše využíván k jiným účelům jako např. detekce uridylace DNA<sup>22</sup>, studium struktury peptidů a proteinů<sup>23</sup>, detekci iontů a jejich vazbu do DNA<sup>24,25</sup>.

Druhou nejvíce používanou molekulou tvořící nanopóry k analýzám DNA je porin A (MspA). Tento extrémně stálý hydrofilní transmembránový protein bakterie *Mycobacterium smegmatis* tvoří oktamerní komplexy s kónickou strukturou<sup>26</sup>. Z hlediska struktury je MspA výhodnější pro nanopórové aplikace než hemolysin. MspA poskytuje silnější procházející proudy, navíc zde nepůsobí rušivý vliv dlouhého  $\beta$ -barelu. Oblast konstriktční zóny, v které je procházející proud nejvíce citlivý na změny struktury translokovaného polynukleotidu, odpovídá zhruba délce dvou nukleotidů

(0,5 nm)<sup>27</sup>. Vzhledem k negativnímu náboji uvnitř konstriktce MspA, je vždy nutné cílenou mutagenézí nahradit negativně nabyté asparátové zbytky neutrálním asparaginem<sup>28</sup>. Bylo prokázáno, že geneticky upravený MspA je schopen rozlišit všechny nukleotidy v ssDNA, pokud je její průchod zpomalován úseky dsDNA<sup>29</sup>.

K dalším proteinům tvořícím póry využitých v nanopórových technikách patří aerolysin<sup>30</sup>, Cytolysin A bakterií druhu *Salmonella typhi* (ClyA)<sup>31</sup>, receptor A pro příjem hydroxamátu železitého bakterie *E. coli* (FhuA)<sup>32</sup>, phi29 protein<sup>33</sup> a SP1 protein<sup>34</sup>.

Rychlé a levné genomové sekvenování pomocí biologických nanopórů má ovšem i v současné době celou řadu výzev. Modulace proudu iontů bazemi nukleové kyseliny procházejícími konstriktcí hemolysinu je ovlivňována a rušena oblastí  $\beta$ -barelu (2 nm v průměru a 5 nm dlouhá). Tato oblast je mnohem delší než vzdálenost jednotlivých bazí (3.4 Å) a tudíž modulace signálu je důsledkem přítomnosti 10–15 bazí v této oblasti<sup>35</sup>. Další technickou překážkou je rychlost translokace nukleové kyseliny hemolysinem. Za 1  $\mu$ s prochází za standartních podmínek hemolysinem jedna báze a cca 100 iontů, jejichž celkový náboj se podílí na rozlišení jednotlivých bazí. Tato doba je daleko pod rozlišovací schopností současných komerčně dodávaných detektorů. Doba translokace 1 ms a cca 1000 iontů procházejících pórem za tuto dobu by byla potřeba pro spolehlivou analýzu sekvence jednotlivých bazí<sup>36</sup>. Zvýšení viskozity elektrolytu, snížení teploty nebo cílená nabitá aminokyseliny mohou částečně snížit rychlost translokace nukleových kyselin pórem, současně však dochází i k snížení mobility iontů a poklesu detekovaných proudů<sup>37-39</sup>. V současné době se snaha zpomalit průchod nukleové kyseliny nanopórem ubírá směrem vložení adaptérů jako je aminocyklohexan do lumen biopóru nebo jeho modifikace enzymem jako Klenow fragment *E. coli* DNA polymerázy nebo phi29 DNA polymerázou<sup>40-42</sup>.

### Solid-state nanopóry

Alternativou k proteinovým nanopóram jsou nanopóry vytvořené litografickými technikami

v pevných substrátech. Nejčastěji se používají membrány na bázi křemíku ( $\text{SiN}$ ,  $\text{Si}_2\text{N}$ ,  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ ) ale třeba i skla<sup>43</sup> a grafenu<sup>44</sup>. Solid-state nanopóry mají oproti biopórům výhodu dobré mechanické, chemické a teplotní stability. Jejich rozměry a tvar mohou být libovolně měněny, na druhou stranu, jsou složitě reprodukovatelné, mají větší kapacitanci a problémy s šumem<sup>45-48</sup>. Ultra tenké membrány jsou vyráběny technikou atomic-layer deposition (ALD), která umožňuje deponovat na relativně velké plochy vrstvy s vynikající uniformitou a kontrolovat jejich složení<sup>49</sup>. Iontovým paprskem jako první vyrobil umělý nanopór v křemíkové membráně k analýze DNA tým pod vedením Golovchenka<sup>50</sup>.

Grafen, dvourozměrný list atomů uhlíku, je z hlediska nanopórového sekvenování nadějným materiálem. Šířka jedné grafenové vrstvy (0,32–0,52 nm) odpovídá vzdálenosti bazí v polynukleotidovém řetězci.

Drndić et al. vyrobil první nanopór v grafenové vrstvě<sup>51</sup> a následně ho použil k analýze DNA<sup>52</sup>. Ačkoliv vzhledem k velmi tenké grafenové vrstvě tento nanopór poskytoval vyšší proudové signály než nanopóry z jiných materiálů, šum byl naopak několikrát vyšší vzhledem k přítomnosti perforací v grafenovém listu. Grafen by navíc mohl být materiálem využitým pro sekvenování pomocí detekce příčné vodivosti<sup>53</sup>, kdy jednotlivé báze v nukleové kyselině translokované solid-state nanopórem vzhledem k jejich různému chemickému složení (hustotám elektronů) přispívají různou měrou k tunelovému proudu mezi elektrodami umístěnými transversálně v oblasti nanopóru.

V případě solid-state nanopórů existuje stejný problém jako u biologických, příliš rychlá translokace nukleové kyseliny pórem. Bashir et al. popsali zpomalení průchodu DNA pórem vyrobeného z  $\text{Al}_2\text{O}_3$ <sup>54</sup>. Při ozáření amorfního nevodivého  $\text{Al}_2\text{O}_3$  paprskem elektronů dochází k změně jeho struktury na krystalickou, což umožňuje v oblasti póru nejen manipulaci s nábojem, ale i vytvoření nanoelektrod a redukci šumu.

## Závěr

I přes limitující faktory, které v současné době komplikují použití nanopórů, se jeví, že by

nanopóry v budoucnosti mohli hrát významnou úlohu v diagnostice a DNA sekvenování. Pokroky ve zpomalení translokace DNA nanopórem, výrobě solid-state nanopórů a jejich aplikace do čipů, nové principy detekce jako například měření příčné vodivosti<sup>53</sup>, použití uhlíkových nanotrubiček jako nanopórů<sup>55</sup> a použití nanofluidických diod<sup>56,57</sup> jsou příslibem rychlých a především cenově dostupných analýz lidského genomu.

*Tato práce byla financována z projektu PGS20\_2013.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. Graham M. D.: Cytometry Part A, 83, 1057 (2013).
2. Deblois R. W., Bean C. P., Wesley R. K. A.: Journal of Colloid and Interface Science, 61, 323 (1977).
3. Wanunu M.: Physics of Life Reviews, 9, 125 (2012).
4. Sanguinetti M. C., Tristani-Firouzi M.: Nature, 440, 463 (2006).
5. Gorlich D., Kutay U.: Annual Review of Cell and Developmental Biology, 15, 607 (1999).
6. Guasch A., Pous J., Ibarra B., Gomis-Ruth F. X., Valpuesta J. M., Sousa N., Carrascosa J. L., Coll M.: Journal of Molecular Biology, 315, 663 (2002).
7. Diep B. A., Otto M.: Trends in Microbiology, 16, 361 (2008).
8. 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., Krstić 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.: Nature Biotechnology, 26, 1146 (2008).
9. Baldarelli R., Branton D., Church G., Deamer D. W., Kasianowicz J.: (1998).
10. van Hooft J. A., Wadman W. J.: Journal of Neurophysiology, 89, 1864 (2003).
11. Purcell E. K., Liu L. Q., Thomas P. V., Duncan R. K.: Plos One, 6, (2011).
12. Laszlo A. H., Derrington I. M., Brinkerhoff H., Langford K. W., Nova I. C., Samson J. M., Bartlett J. J., Pavlenok M., Gundlach J. H.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 18904 (2013).
13. Meller A., Nivon L., Brandin E., Golovchenko J.,

- Branton D.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 1079 (2000).
14. Storm A. J., Chen J. H., Zandbergen H. W., Dekker C.: *Physical Review E*, 71, (2005).
  15. Venkatesan B. M., Bashir R.: *Nature Nanotechnology*, 6, 615 (2011).
  16. Walker B., Krishnasastry M., Zorn L., Kasianowicz J., Bayley H.: *Journal of Biological Chemistry*, 267, 10902 (1992).
  17. Walker B., Kasianowicz J., Krishnasastry M., Bayley H.: *Protein Engineering*, 7, 655 (1994).
  18. Kasianowicz J. J., Brandin E., Branton D., Deamer D. W.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 13770 (1996).
  19. Song L. Z., Hobaugh M. R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J. E.: *Science*, 274, 1859 (1996).
  20. Akeson M., Branton D., Kasianowicz J. J., Brandin E., Deamer D. W.: *Biophysical Journal*, 77, 3227 (1999).
  21. Meller A., Branton D.: *Electrophoresis*, 23, 2583 (2002).
  22. Clamer M., Hofler L., Mikhailova E., Viero G., Bayley H.: *Acs Nano*, 8, 1364 (2014).
  23. Lee J. S.: *Protein and Peptide Letters*, 21, 247 (2014).
  24. Wang G. H., Wang L., Han Y. J., Zhou S., Guan X. Y.: *Biosensors & Bioelectronics*, 53, 453 (2014).
  25. Asandei A., Schiopu I., Ifemi S., Mereuta L., Luchian T.: *Langmuir*, 29, 15634 (2013).
  26. Stahl C., Kubetzko S., Kaps I., Seeber S., Engelhardt H., Niederweis M.: *Molecular Microbiology*, 40, 451 (2001).
  27. Faller M., Niederweis M., Schulz G. E.: *Science*, 303, 1189 (2004).
  28. Butler T. Z., Pavlenok M., Derrington I. M., Niederweis M., Gundlach J. H.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 20647 (2008).
  29. Derrington I. M., Butler T. Z., Collins M. D., Manrao E., Pavlenok M., Niederweis M., Gundlach J. H.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 16060 (2010).
  30. Fennouri A., Przybylski C., Pastoriza-Gallego M., Bacri L., Auvray L., Daniel R.: *Acs Nano*, 6, 9672 (2012).
  31. Soskine M., Biesemans A., Moeyaert B., Cheley S., Bayley H., Maglia G.: *Nano Letters*, 12, 4895 (2012).
  32. Mohammad M. M., Iyer R., Howard K. R., McPike M. P., Borer P. N., Movileanu L.: *Journal of the American Chemical Society*, 134, 9521 (2012).
  33. Chen Y. S., Lee C. H., Hung M. Y., Pan H. A., Chiou J. C., Huang G. S.: *Nature Nanotechnology*, 8, 452 (2013).
  34. Wang H. Y., Li Y., Qin L. X., Heyman A., Shoseyov O., Willner I., Long Y. T., Tian H.: *Chemical Communications*, 49, 1741 (2013).
  35. Stoddart D., Heron A. J., Mikhailova E., Maglia G., Bayley H.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 7702 (2009).
  36. Deamer D. W., Branton D.: *Accounts of Chemical Research*, 35, 817 (2002).
  37. Kawano R., Schibel A. E. P., Cauley C., White H. S.: *Langmuir*, 25, 1233 (2009).
  38. de Zoysa R. S. S., Jayawardhana D. A., Zhao Q. T., Wang D. Q., Armstrong D. W., Guan X. Y.: *Journal of Physical Chemistry B*, 113, 13332 (2009).
  39. Rincon-Restrepo M., Milthallova E., Bayley H., Maglia G.: *Nano Letters*, 11, 746 (2011).
  40. Hurt N., Wang H. Y., Akeson M., Lieberman K. R.: *Journal of the American Chemical Society*, 131, 3772 (2009).
  41. Wu H. C., Astier Y., Maglia G., Mikhailova E., Bayley H.: *Journal of the American Chemical Society*, 129, 16142 (2007).
  42. Lieberman K. R., Cherf G. M., Doody M. J., Olasagasti F., Kolodji Y., Akeson M.: *Journal of the American Chemical Society*, 132, 17961 (2010).
  43. Gong X. Q., Patil A. V., Ivanov A. P., Kong Q. Y., Gibb T., Dogan F., deMello A. J., Edl J. B.: *Analytical Chemistry*, 86, 835 (2014).
  44. Hu G. H., Mao M., Ghosal S.: *Nanotechnology*, 23, (2012).
  45. Tabard-Cossa V., Trivedi D., Wiggin M., Jetha N. N., Marziali A.: *Nanotechnology*, 18, (2007).
  46. Storm A. J., Chen J. H., Ling X. S., Zandbergen H. W., Dekker C.: *Nature Materials*, 2, 537 (2003).
  47. Hoogerheide D. P., Garaj S., Golovchenko J. A.: *Physical Review Letters*, 105, (2010).
  48. Smeets R. M. M., Keyser U. F., Wu M. Y., Dekker N. H., Dekker C.: *Physical Review Letters*, 97, (2006).
  49. Kim W. K., Nam W. H., Kim S. H., Rhee S. W.: *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 38, 578 (2005).
  50. Li J., Stein D., McMullan C., Branton D., Aziz M. J., Golovchenko J. A.: *Nature*, 412, 166 (2001).
  51. Fischbein M. D., Drndic M.: *Applied Physics Letters*, 93, (2008).
  52. Merchant C. A., Healy K., Wanunu M., Ray V., Peterman N., Bartel J., Fischbein M. D., Venta K., Luo Z. T., Johnson A. T. C., Drndic M.: *Nano Letters*, 10, 2915 (2010).
  53. Postma H. W. C.: *Nano Letters*, 10, 420 (2010).
  54. Venkatesan B. M., Shah A. B., Zuo J. M., Bashir R.: *Advanced Functional Materials*, 20, 1266 (2010).
  55. Liu H. T., He J., Tang J. Y., Liu H., Pang P., Cao D., Krstic P., Joseph S., Lindsay S., Nuckolls C.: *Science*, 327, 64 (2010).
  56. Jin X. Z., Aluru N. R.: *Microfluidics and Nanofluidics*, 11, 297 (2011).
  57. Karnik R., Duan C. H., Castelino K., Daiguji H., Majumdar A.: *Nano Letters*, 7, 547 (2007).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.