



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102186989 B

(45) 授权公告日 2021.06.29

(21) 申请号 200980140663.0

(22) 申请日 2009.09.03

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 102186989 A

(43) 申请公布日 2011.09.14

(30) 优先权数据  
61/093,885 2008.09.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2011.04.14

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2009/055876 2009.09.03

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02010/028140 EN 2010.03.11

(73) 专利权人 纳伯塞斯2.0有限责任公司  
地址 美国罗德岛

(72) 发明人 凌新生 B·布兰迪  
J·S·奥利弗 M·尤兹  
L·帕特罗塞安

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

代理人 曲瑞

(51) Int.Cl.  
G01N 33/487 (2006.01)  
G01N 27/327 (2006.01)  
G01N 27/447 (2006.01)  
B01L 3/00 (2006.01)  
B82Y 15/00 (2011.01)

(56) 对比文件

WO 01/18246 A1, 2001.03.15

WO 2004035311 A2, 2004.04.29

WO 2007041621 A2, 2007.04.12

Xiaogan Liang and Stephen Y.

Chou. Nanogap Detector Inside Nanofluidic Channel for Fast Real-Time Label-Free DNA Analysis.《NANO LETTERS》.2008,第8卷(第5期),1472-1474.

审查员 刘超

权利要求书3页 说明书14页 附图8页

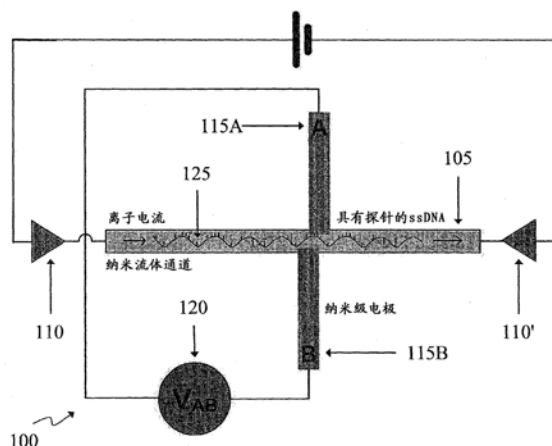
### (54) 发明名称

用于流体通道中生物分子和其它分析物的电压感测的纵向移位纳米级电极的使用

### (57) 摘要

提供了用于检测分析物的装置和方法。用于分析物的电压感测的装置(100)可包括:限定在基片中的流体通道(105);感测电极对(115A、115B),位于流体通道中以用于感测该流体通道中的电压;以及电动势电极对(110、110'),用于沿流体通道施加电势。所述感测电极对可包括位于沿流体通道的长度的两个分离位置的第一感测电极和第二感测电极,所述电动势电极对可位于流体通道的第一端和第二端。所述流体通道可包括纳米通道或微米通道。用于检测分析物的方法可包括下述步骤:把分析物布置在流体通道中;沿流体通道施加电势以在流体通道中产生电泳力,从而使分析物从流体通道的第一端向流体

通道的第二端移位;当分析物移经位于流体通道中的感测电极对时测量该感测电极对之间的电压信号。



1. 一种用于分析物的电压感测的装置,该装置包括:

限定在基片中的流体通道;

感测电极对,位于通道中以用于感测该通道中的电压,该感测电极对包括位于沿流体通道的长度的两个分离的纵向移位位置的第一感测电极和第二感测电极,所述第一感测电极和第二感测电极被配置用于感测所述第一感测电极和第二感测电极之间的在所述流体通道的长度方向上的电压,该感测电极对 (i) 连接到用于测量通过该感测电极对感测的电压的测量工具而 (ii) 不连接到电压源;以及

电动势电极对,位于流体通道的第一端和第二端,用于沿流体通道施加电势,

其中所述流体通道包括纳米通道或微米通道。

2. 如权利要求1所述的装置,其中所述基片包括从硅、二氧化硅、熔融硅石和砷化镓选择的材料。

3. 如权利要求1所述的装置,其中所述感测电极对和电动势电极对中的每个包括从铂、金、铬、钛、氯化银、银和石墨烯选择的材料。

4. 如权利要求1所述的装置,其中第一感测电极位于流体通道的第一侧上,第二感测电极位于流体通道的相对侧上。

5. 如权利要求1所述的装置,其中第一感测电极和第二感测电极中的每个感测电极位于流体通道的第一侧上。

6. 如权利要求1所述的装置,其中第一感测电极和第二感测电极中的至少一个感测电极横跨流体通道。

7. 如权利要求1所述的装置,其中所述电动势电极对包括宏观电极,该宏观电极在流体通道中产生恒定、变化或振荡的电泳力以用于位于流体通道中的分析物的移位。

8. 如权利要求1所述的装置,还包括:多个流体通道。

9. 如权利要求1所述的装置,其中所述流体通道具有从1nm到5 $\mu$ m的范围选择的宽度。

10. 如权利要求1所述的装置,其中所述流体通道具有从1nm到5 $\mu$ m的范围选择的深度。

11. 如权利要求1所述的装置,其中所述流体通道具有从1 $\mu$ m到10cm的范围选择的长度。

12. 一种用于检测分析物的方法,该方法包括下述步骤:

把分析物布置在流体通道中;

沿流体通道施加电势;

使分析物从流体通道的第一端向流体通道的第二端移位;

当分析物移经位于流体通道中的用于感测该流体通道中的电压的感测电极对时测量该感测电极对之间的电压信号,该感测电极对包括位于沿流体通道的长度的两个分离的纵向移位位置的第一电极和第二电极,所述第一感测电极和第二感测电极被配置用于感测所述第一感测电极和第二感测电极之间的在所述流体通道的长度方向上的电压,该感测电极对 (i) 连接到用于测量通过该感测电极对感测的电压的测量工具而 (ii) 不连接到电压源,

其中所述流体通道包括纳米通道或微米通道。

13. 如权利要求12所述的方法,其中沿流体通道施加电势的步骤包括:在流体通道中产生电泳力。

14. 如权利要求12所述的方法,其中所述分析物包括从脱氧核糖核酸、核糖核酸和多肽选择的生物聚合物。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述生物聚合物包括单链分子。

16. 如权利要求12所述的方法,其中所述分析物包括生物聚合物,该生物聚合物具有附接于它的至少一个探针。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述电压信号在生物聚合物移经感测电极之间的体积时变化,并且在生物聚合物的包括探针的部分移经感测电极之间的体积时进一步变化。

18. 如权利要求17所述的方法,还包括:记录电压信号变化之间的时间。

19. 如权利要求18所述的方法,其中电压信号的变化的持续时间指示探针的存在,还包括:使用该电压信号确定生物聚合物上的两个探针之间的距离。

20. 如权利要求12所述的方法,还包括:使用电压信号的变化的持续时间确定分析物的长度。

21. 一种用于确定生物聚合物的序列的方法,该方法包括:

制备包括生物聚合物的分析物;

把分析物布置在流体通道中;

沿流体通道施加电势;

使分析物从流体通道的第一端向流体通道的第二端移位;

当分析物移经位于流体通道中的用于感测该流体通道中的电压的感测电极对时测量该感测电极对之间的电压信号,该电压信号对应于沿生物聚合物的位置,该感测电极对包括位于沿流体通道的长度的两个分离的纵向移位位置的第一电极和第二电极,所述第一感测电极和第二感测电极被配置用于感测所述第一感测电极和第二感测电极之间的在所述流体通道的长度方向上的电压,该感测电极对 (i) 连接到用于测量通过该感测电极对感测的电压的测量工具而 (ii) 不连接到电压源,

其中所述流体通道包括纳米通道或微米通道。

22. 如权利要求21所述的方法,其中沿流体通道施加电势的步骤包括:在流体通道中产生电泳力。

23. 如权利要求21所述的方法,其中制备分析物的步骤包括:使生物聚合物与探针杂交。

24. 如权利要求23所述的方法,其中电压信号的变化对应于沿包含探针的杂交的生物聚合物的位置。

25. 如权利要求21所述的方法,还包括:使用计算机算法处理电压信号以重构生物聚合物的序列。

26. 如权利要求21所述的方法,其中所述生物聚合物包括双链生物聚合物目标分子。

27. 如权利要求26所述的方法,其中制备分析物的步骤包括:使目标分子与具有用于目标分子的识别部位的第一探针特异性的第一探针接触以形成第一多个局部复合物,第一探针具有第一预测识别部位序列。

28. 如权利要求27所述的方法,还包括:使用电压信号确定第一多个局部复合物的位置信息。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述位置信息包括与两个局部复合物之间的空间距离对应的参数。

30. 如权利要求28所述的方法,其中制备分析物的步骤还包括:使目标分子与具有用于目标分子的识别部位的第二探针特异性的第二探针接触以形成第二多个局部复合物,第二探针具有第二预测识别部位序列。

31. 如权利要求30所述的方法,还包括:使用电压信号确定第二多个局部复合物的位置信息。

32. 如权利要求31所述的方法,还包括:排列至少第一多个局部复合物和第二多个局部复合物的位置信息以确定目标的DNA序列。

33. 如权利要求21所述的方法,其中所述生物聚合物包括双链核酸目标分子,该双链核酸目标分子具有沿其序列布置的多个结合部位。

34. 如权利要求33所述的方法,其中制备分析物的步骤包括:把具有第一序列特异性的多个探针分子加入到双链核酸目标分子。

35. 如权利要求34所述的方法,还包括:培养目标分子和具有第一序列特异性的探针分子,以实现第一探针分子优先结合到目标分子的第一结合部位和第二结合部位。

36. 如权利要求35所述的方法,还包括:使用电压信号测量与第一结合部位和第二结合部位之间的距离相关的参数。

37. 如权利要求21所述的方法,其中制备分析物的步骤包括:使生物聚合物与第一探针接触以在第一探针针对其具有已知特异性的生物聚合物的识别部位产生至少一个探针目标复合物,同时剩下第一探针针对其不具有特异性的生物聚合物的未复合的区域。

38. 如权利要求37所述的方法,其中制备分析物的步骤还包括:使生物聚合物与第二探针接触以在第二探针针对其具有已知特异性的生物聚合物的识别部位产生至少一个探针目标复合物,同时剩下第二探针针对其不具有特异性的目标的未复合的区域。

39. 如权利要求38所述的方法,还包括:使用电压信号检测和记录生物聚合物的复合和未复合的区域以创建第一探针的第一探针图谱和第二探针的第二探针图谱,第一探针图谱和第二探针图谱包括关于探针的杂交的相对位置的信息。

40. 如权利要求39所述的方法,还包括:通过使用位置信息或探针分子的交迭序列和位置信息的组合整理至少两个探针序列,确定候选序列。

41. 如权利要求38所述的方法,其中第一探针图谱和第二探针图谱还包括关于每个探针的位置信息的误差的信息。

42. 如权利要求41所述的方法,还包括:通过使用位置信息和与位置信息的误差相关的参数或探针分子的交迭序列和位置信息以及位置信息的误差的组合整理至少两个探针序列,确定候选序列。

## 用于流体通道中生物分子和其它分析物的电压感测的纵向移位纳米级电极的使用

[0001] 本申请要求2008年9月3日提交的序列号为61/093,885的美国临时申请的根据35U.S.C. §119(e)的优先权的利益;其全部内容通过引用包含于此。

### 技术领域

[0002] 本发明一般地涉及生物聚合物测序。更具体地讲,在某些实施例中,本发明涉及确定生物聚合物的长度和结合到生物聚合物的探针的距离。

### 背景技术

[0003] 称为Coulter计数的技术在二十世纪四十年代末首先由Wallace H.Coulter作为用于红血球的高速计数的技术提出。Coulter计数还称为电阻脉冲感测,可用于测量电解质溶液中的分析物的物理参数,包括尺寸(体积)、电荷、电泳淌度和浓度。在这种技术中,两个溶液的贮液器由已知尺寸的流体阻塞物分开。在这两个贮液器之间施加恒定DC电压导致测量的基线离子电流。基线电流的大小与电解质的电导率、施加的电势、通道的长度和通道的横截面面积相关。如果分析物被引入到贮液器中,则它可以穿过流体通道并由于电解质溶液和分析物之间的电导率的差异而减小观测的电流。电流的减小的幅度取决于在分析物处于流体通道中的同时由分析物取代的电解质的体积。

[0004] 电阻脉冲感测技术的好处在于,它可以缩小比例以便通过使用纳米级流体阻塞物能够实现纳米级分析物的检测。这种能力导致了用于检测纳米级分子(诸如,DNA)的固态纳米孔的开发。

[0005] 在通过纳米孔的DNA移位的情况下,物理移位由所施加的DC电压产生的电泳力驱动。这种驱动力和检测的信号因此通常不可分离地耦合。可能希望对这两种效果去耦合,因为用于物理移位的最佳电势不同于最佳测量的电势。

[0006] 已提出横向电极以便提供横向电场和电流从而感测被限制在纳米流体通道中的生物分子。参见Liang and Chou 2008Liang,X;Chou,S.Y.,Nanogap Detector Inside Nanofluidic Channel for Fast Real-Time Label-Free DNA Analysis.Nano Lett.2008,8,1472-1476,其内容通过引用全部包含于此。分析物利用由位于纳米通道的端部的载流电极产生的电泳力移动穿过通道,因此对测量与移位速度去耦合。

### 发明内容

[0007] 本发明的实施例提供了这样的装置和方法:使用电极感测电压变化而非产生横向电流,由此减小电极的退化。特别地,本文描述的装置使用纵向移位电极以用于流体通道中的生物分子和其它纳米级分析物的电子感测。实施例能够实现纳米级分析物的表征,例如包括具有探针附接于其上的DNA链的分析。

[0008] 更具体地讲,本发明的实施例可使用感测电极以用于流体通道中的分析物(例如,DNA)的电子感测。流体通道中的感测电极可用于确定分析物的长度或者它们可用于确定杂

交到DNA的目标链的探针之间的距离。该装置设计类似于用于光学检测的纳米通道装置。可以按照100到200 $\mu\text{m}$ 的距离加工两个微米级贮液器。一个或多个流体通道可连接这两个贮液器。通过钻出允许把流体引入到每个贮液器并为宏观电极提供通路的孔可以加工盖层。在使用中,电压表可用于监测两个感测电极之间的电势差。

[0009] 待分析的DNA可以被引入到微流体贮液器之一。宏观电极可连接到电源并用于在这两个贮液器之间施加电势。DNA片段可以被以电泳方式从微观贮液器驱动到纳米通道。当每个DNA片段沿流体通道移动时,它可以进入和离开位于流体通道中的感测电极对。

[0010] 在不存在DNA的情况下,流体通道仅包含离子溶液并且通常具有在两个感测电极之间测量的基线电势差。当DNA进入流体通道时,这两个感测电极之间测量的电势可变化,因为DNA具有与离子溶液的电导率不同的电导率。当DNA进入流体通道时,这两个感测电极之间的通道的电导率通常减小,因为DNA导电性差于缓冲溶液(参见de Pablo,P.J.;Moreno-Herrero,F;Colchero,J.;Gomez-Herrero,J.;Herrero,P.;Baro,A.M.;Ordejon,P.;Soler,J.M.;Artacho,E.Absence of dc-Conductivity in Phys.Rev.Lett.2000,85,4992-4995,其全部内容通过引用包含于此)。当具有杂交到DNA的探针的DNA的部分进入流体通道时,电势可进一步变化。可分析测量的信号以确定DNA的长度和/或探针之间的距离。

[0011] 在一方面,本发明的实施例包括一种用于分析物的电压感测的装置。该装置可包括:限定在基片中的流体通道;和感测电极对,位于流体通道中以用于感测该流体通道中的电压。所述感测电极对可包括位于沿流体通道的长度的两个分离位置的第一感测电极和第二感测电极。电动势电极对可位于流体通道的第一端和第二端,用于沿流体通道施加电势。所述流体通道可包括或基本上包括纳米通道或微米通道。

[0012] 可包括一个或多个下面的特征。所述基片可包括或基本上包括硅、二氧化硅、熔融硅石和/或砷化镓。所述感测电极对和电动势电极对中的每个电极可包括或基本上包括铂、金、铬、钛、氯化银、银和石墨烯。

[0013] 第一感测电极可位于流体通道的第一侧上,第二感测电极可位于流体通道的相对侧上。第一感测电极和第二感测电极中的每个感测电极可位于流体通道的第一侧上,或者第一感测电极和第二感测电极中的每个感测电极可横跨流体通道。第一感测电极可横跨流体通道,第二感测电极可位于流体通道的一侧上。

[0014] 所述电动势电极对可包括宏观电极,该宏观电极在流体通道中产生恒定、变化或振荡的电泳力以用于位于流体通道中的分析物的移位。

[0015] 可提供测量工具(诸如,电压表)以用于测量由感测电极对感测的电压。该装置可包括多个流体通道。电压放大器可位于基片上。

[0016] 所述流体通道可具有从1nm到5 $\mu\text{m}$ 的范围选择的宽度,从1nm到5 $\mu\text{m}$ 的范围选择的深度,和/或从1 $\mu\text{m}$ 到10cm的范围选择的长度。

[0017] 本发明的其它方面的实施例的元素的描述也可以应用于本发明的这个方面。

[0018] 在另一方面,本发明的特征在于一种用于检测分析物的方法,该方法包括:把分析物布置在流体通道中。沿流体通道施加电势,并且使分析物从流体通道的第一端向流体通道的第二端移位。当分析物移经位于流体通道中的感测电极对时测量该感测电极对之间的电压信号,该感测电极对包括位于沿流体通道的长度的两个分离位置的第一电极和第二电极。所述流体通道可包括或基本上包括纳米通道或微米通道。

[0019] 沿流体通道施加电势的步骤可包括：在流体通道中产生电泳力。使分析物移位的步骤可包括：使用压力差和/或化学梯度。

[0020] 可包括一个或多个下面的特征。所述分析物可包括生物聚合物，诸如脱氧核糖核酸、核糖核酸和/或多肽。所述生物聚合物可包括或基本上包括单链分子。所述分析物可包括或基本上包括生物聚合物，该生物聚合物具有附接于它的至少一个探针。

[0021] 所述电压信号可在生物聚合物移经感测电极之间的体积时变化，并且在生物聚合物的包括探针的部分移经感测电极之间的体积时进一步变化。可记录电压信号变化之间的时间。电压信号的变化的持续时间可指示探针的存在，该电压信号可用于确定生物聚合物上的两个探针之间的距离。

[0022] 电压信号的变化的持续时间可用于确定分析物的长度。多个感测电极对可用于在单个分析物分子穿过流体通道时测量该分析物分子。

[0023] 本发明的其它方面的实施例的元素的描述也可以应用于本发明的这个方面。

[0024] 在另一方面，一种用于确定生物聚合物的序列的方法可包括：制备包括生物聚合物的分析物。可以把分析物布置在流体通道中。可以沿流体通道施加电势，并且使分析物从流体通道的第一端向流体通道的第二端移位。当分析物移经位于流体通道中的感测电极对时可以测量该感测电极对之间的电压信号，该电压信号对应于沿生物聚合物的位置，该感测电极对包括位于沿流体通道的长度的两个分离位置的第一电极和第二电极。所述流体通道可包括或基本上包括纳米通道或微米通道。

[0025] 沿流体通道施加电势可包括：在流体通道中产生电泳力。分析物可以通过使用压力差和/或化学梯度移位。

[0026] 可包括一个或多个下面的特征。制备分析物的步骤可包括：使生物聚合物与探针杂交。电压信号的变化可对应于沿包含探针的杂交的生物聚合物的位置。可以使用计算机算法处理电压信号以重构生物聚合物的序列。所述生物聚合物可包括或基本上包括双链生物聚合物目标分子。制备分析物的步骤可包括：使目标分子与具有用于目标分子的识别部位的第一探针特异性的第一探针接触以形成第一多个局部三元复合物，第一探针具有第一预测识别部位序列。所述电压信号可用于确定第一多个局部三元复合物的位置信息。所述位置信息可包括与两个局部三元复合物之间的空间距离对应的参数。

[0027] 制备分析物的步骤还可包括：使目标分子与具有用于目标分子的识别部位的第二探针特异性的第二探针接触以形成第二多个局部三元复合物，第二探针具有第二预测识别部位序列。

[0028] 电压信号可用于确定第二多个局部三元复合物的位置信息。可以排列至少第一多个局部三元复合物和第二多个局部三元复合物的位置信息以确定目标的DNA序列。

[0029] 所述生物聚合物可包括或基本上包括双链核酸目标分子，该双链核酸目标分子具有沿其序列布置的多个结合部位。制备分析物的步骤可包括：把具有第一序列特异性的多个探针分子加入到双链核酸目标分子。

[0030] 可以培养培养目标分子和具有第一序列特异性的探针分子，以实现第一探针分子优先结合到目标分子的第一结合部位和第二结合部位。所述电压信号可用于测量与第一结合部位和第二结合部位之间的距离相关的参数。

[0031] 制备分析物的步骤可包括：使生物聚合物与第一探针接触以在第一探针针对其具

有已知特异性的生物聚合物的识别部位产生至少一个探针目标复合物,同时剩下第一探针针对其不具有特异性的生物聚合物的未复合的区域。制备分析物的步骤还可包括:使生物聚合物与第二探针接触以在第二探针针对其具有已知特异性的生物聚合物的识别部位产生至少一个探针目标复合物,同时剩下第二探针针对其不具有特异性的未复合的区域。

[0032] 所述电压信号可用于检测和记录生物聚合物的复合和未复合的区域以创建第一探针的第一探针图谱和第二探针的第二探针图谱,第一探针图谱和第二探针图谱包括关于探针的杂交的相对位置的信息。通过使用位置信息或探针分子的交迭序列和位置信息的组合排列至少两个探针序列,可以确定候选序列。第一探针图谱和第二探针图谱可包括关于每个探针的位置信息的误差的信息。通过使用位置信息和与位置信息的误差相关的参数或探针分子的交迭序列和位置信息以及位置信息的误差的组合,可以确定候选序列。

[0033] 本发明的其它方面的实施例的元素的描述也可以应用于本发明的这个方面。

## 附图说明

[0034] 图1是表示根据本发明实施例的纵向移位横向电极装置结构的示意图;

[0035] 图2是表示根据本发明另一实施例的纵向移位横向电极装置结构的示意图;

[0036] 图3是表示根据本发明另一实施例的纵向移位连续横向纳米级电极装置结构的示意图;

[0037] 图4是表示根据本发明实施例的具有位于纳米通道的同一侧的电极的纵向移位纳米级电极装置结构的示意图;

[0038] 图5是DNA分子的示意图;

[0039] 图6是RNA分子的示意图;

[0040] 图7是杂交的寡核苷酸(或探针)的示意图;

[0041] 图8是与探针杂交的单链DNA分子的示意图;

[0042] 图9是根据本发明实施例确定的示例性电压信号的曲线图。

## 具体实施方式

[0043] 流体通道和感测电极的加工

[0044] 本发明的实施例包括用于执行杂交测序分析(“SBH”)的装置和方法。参照图1,在实施例中,装置100包括流体通道105,例如微米或纳米通道。电动势电极对110、110'位于流体通道105的第一端和第二端以用于沿流体通道施加电势。感测电极对115A、115B位于沿流体通道的长度的两个分离位置。感测电极可以与测量由感测电极感测的电压的测量工具120保持电气连通。流体通道105可以限定在基片(该基片包括硅、二氧化硅、熔融硅石或砷化镓)中,并且可包含电解质溶液。电动势电极对110、110'可包括至少一个阳极110'和阴极110',该至少一个阳极110'和阴极110'与电解质溶液接触以提供用于驱动分析物125以使其穿过流体通道105的恒定或变化的电流。在替代实施例中,压力差(诸如,正压)可用于驱动分析物125以使其穿过流体通道105。可利用流体泵或利用压气管线提供压力。本领域技术人员可设想施加压力的其它方法。在一些实施例中,化学势梯度可用于移动分子以使其穿过流体通道105。分析物也可以通过使用化学势梯度移位。可以利用浓度梯度产生化学势梯度。例如,流体通道可以使一端浸入在盐浓度比通道的另一端的流体更高的流体中。流体



通道的端部的盐浓度的差异引起渗透压力,该渗透压力能够驱动分析物以使其穿过通道。

[0045] 当分析物125(可以是任何生物聚合物,包括但不限于多肽、DNA或RNA)穿过流体通道105时,它将会穿过感测电极对115A、115B(每个感测电极在本文中分别称为“A”和“B”)。与流体通道105接触的感测电极115A、115B可用于测量它们之间的电解质体积的电导率的变化。使用测量工具120(例如,电压表)可以测量感测电极115A、115B之间的电导率的变化。

[0046] 通过使感测电极115A、115B之间的纵向距离(例如,沿流体通道105的长度)较小,装置100保持对从其穿过的分析物125的高灵敏度。感测电极对中的每个感测电极115A、115B可位于流体通道105的相对侧,如图1中所示,其中感测电极115A、115B的末端与电解质溶液接触并且完全或者部分地彼此交叉,或者如图2中所示,其中感测电极115A、115B的末端彼此不交叉,而是相对于彼此纵向移位所选择的距离。另一方面,感测电极对中的每个感测电极115A、115B可横跨流体通道105,如图3中所示。参照图4,在第三种排列中,感测电极对中的两个感测电极115A、115B可以位于流体通道105的同一侧。

[0047] 本文描述的装置100可通过加工用于限定具有纳米级尺寸的流体通道105的沟槽以及加工纳米级电极来形成。典型装置100也可以具有用于引入缓冲溶液和样本的微米级流体结构。因此,本文描述的采用纳米通道的技术也可适用于包括微米级通道的装置。一些结构或所有结构也可以利用盖层密封以便提供封闭的通道。

[0048] 流体通道可以通过例如光刻和蚀刻步骤形成在基片中。基片可以是例如具有例如(100)Si表面的绝缘体上硅晶片、Si晶片或熔融硅石基片。亚100纳米(nm)体系中的光刻可以通过多种技术来执行,包括:电子束光刻(EBL)、纳米压印光刻(NIL)、深紫外光光刻(DUVOL)。参见Liang,X.;Morton,K.J.;Austin,R.H.;Chou,S.Y.,Single sub-20nm wide, centimeter-long nanofluidic channel fabricated by novel nanoimprint mold fabrication and direct imprinting,Nano Lett.2007,7,3774-3780;Austin,M.D.;Ge,H.;Wu,W.;Li,M.;Yu,Z.;Wasserman,D.;Lyon,S.A.;Chou,S.Y.,Fabrication of 5nm line width and 14nm pitch features by nanoimprint lithography,App.Phys.Lett.2004,84,5299-5301;和Guo,J.,Recent progress in nanoimprint technology and its applications,J.Phys.D:Appl.Phys.2004,37,R123-R141。这些参考文件中的每个文件的全部内容通过引用包含于此。微米和纳米加工的当前工业标准是光刻技术,因为它成本低并且产量高。当前,光刻技术已成功用于临界尺寸小至32nm的装置的大规模生产。由于其通用性和可再生产亚10nm特征的能力,EBL和NIL现在广泛用于学术研究环境。这些方法中的任何方法可用于对本文描述的流体沟槽进行图案化。

[0049] 可通过例如蚀刻来执行用于形成流体沟槽的材料去除。湿法蚀刻包括把材料浸入在能够选择性去除的溶液中。干法蚀刻(即,反应离子蚀刻(RIE))包括把样本暴露于带电等离子体。对于纳米级加工所需的分辨率和控制,RIE是优选的,原因在于其一致性、可控制性和效率。通向纳米级通道的微米流体通道或贮液器可使用湿法或干法来蚀刻。

[0050] 所获得的通道的宽度和深度的优选尺寸为从1nm到5 $\mu$ m,更优选地为从1nm到1 $\mu$ m,更加优选地为从10nm到100nm。通道可具有从例如1微米( $\mu$ m)到10厘米(cm)的范围选择的长度。

[0051] 可参照分析物的持续长度选择通道的尺寸。例如,当被引入到有限空间时随机卷曲聚合物(例如,DNA)可被拉长,从而当有限空间变得更小时拉长的程度变得更大。在一些

实施例中,可以优选地拉长分析物以测量探针之间的长度或距离。根据横截面尺寸和持续长度,使通道的宽度和深度的几何平均数处于分析物的持续长度的5%和500%之间可能会比较有用。例如,对于双链DNA,在持续长度为50nm的条件下,可以优选地使例如流体通道具有2.5nm到250nm之间的宽度和深度。在其它实施例中,对于更坚硬的聚合物(诸如,涂覆了RecA的DNA),在持续长度为950nm的条件下,可以优选地使例如流体通道具有45nm到4.75 $\mu$ m之间的宽度和深度。

[0052] 在形成通道之后,加工感测电极。类似于蚀刻和光刻,在常规微细加工工艺流程中存在很多适合加工感测电极的金属沉积技术。每种技术具有正面属性和负面属性以及可使用该技术沉积的一系列材料。三种主要技术是:电子束蒸发、热蒸发和溅射法。感测电极在感测电极与流体通道相交的点处具有从5nm到100nm的厚度。感测电极在远离流体通道并且接近位于装置的周边的接触垫的区域中可以更宽和/或更厚。

[0053] 为了完成该装置,可以引入盖层以防止液体从流体通道蒸发。盖层可以仅形成在纳米级流体路径上或者形成在全部流体通道上。在后者的情况下,盖层结构优选地具有孔或出入口以允许把流体和样本引入到流体路径中。在另一实施例中,可以覆盖整个基片(即,晶片)。盖层可以由玻璃板制成,诸如硼硅酸盐玻璃、磷硅酸盐玻璃、石英、熔融硅石、熔融石英、硅晶片或其它合适的基片。多种技术适合完成这个步骤,包括阳极键合法。在阳极键合法中,把基础硅晶片和玻璃基片压在一起并加热,同时在接合处施加大的电场。已经证明阳极键合法在硅晶片和覆盖基片之间形成强键。直接硅键合已用于接合两个硅晶片。后者的方法包括在水中把两个硅晶片压在一起。其它方法使用粘合层(诸如,光致抗蚀剂)把盖层结合到基片。

[0054] 用于限定提出的感测元件的示例性加工工艺如下。合适的基片(诸如,常规(100)p型硅晶片)在含水的大气中进行热氧化以生长厚(例如, $>1\mu$ m)的二氧化硅( $\text{SiO}_2$ )层。这个 $\text{SiO}_2$ 层可用作随后形成的相邻金属感测电极之间的绝缘层,并且还可以减小总装置电容。

[0055] 通过使用常规高分辨率光刻,流体通道的图案可以转移到第一光致抗蚀剂掩模层。利用各向异性蚀刻剂种类(诸如, $\text{Cl}_2$ )的RIE可用于把图案转移到 $\text{SiO}_2$ 层中。根据对装置灵敏度的要求可确定通道的优选宽度和深度。两个感测电极之间的通道的体积越小,装置越灵敏。通道尺寸、宽度和深度也可以根据分析物的尺寸或行为来确定。在一个实施例中,本文描述的装置用于检测DNA的链。可能希望加工具有使DNA链在通道内伸长的尺寸的通道。例如,对于双链DNA,已发现使用具有100nm或更小的尺寸的通道能够使生物聚合物伸长。参见Tegenfeldt,J.O等The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels.Proc.Nat.Acad.Sci.USA,2004,101,10979-10983,其全部内容通过引用包含于此。当完成干法蚀刻过程时,去除残留抗蚀剂并且用力地清洁基片。

[0056] 在流体通道的蚀刻之后,加工嵌入的金属感测电极。常规高分辨率光刻可用于把金属电极图案转移到第二光致抗蚀剂掩模层。利用各向异性蚀刻剂种类(诸如, $\text{Cl}_2$ )的RIE将用于把图案转移到 $\text{SiO}_2$ 层中。优选地,这些沟槽的深度超过或等于流体通道的深度。当完成把图案转移到 $\text{SiO}_2$ 层时,可沉积薄金属粘合促进层。适合的层是经电子束蒸发沉积的厚度为**30-50Å**的钽。接下来,沉积感测电极材料而不使基片暴露于大气。用于感测电极的块体的优选金属是铂,它也经电子束蒸发沉积。合适金属的其它例子包括金、铬、钛、氯化银、银和石墨烯。金属的厚度由蚀刻的沟槽的深度决定,从而所获得的金属轨迹近似地与 $\text{SiO}_2$

层的顶表面处于同一平面。当金属沉积完成时,基片浸入在将会从表面溶脱过多的金属的光致抗蚀剂溶剂中,并且用力地清洁基片。可执行化学机械抛光(CMP)以去除在 $\text{SiO}_2$ 顶表面上延伸的过多金属,由此使金属的顶表面平面化从而与 $\text{SiO}_2$ 顶表面平齐。

[0057] 为了完成传感器的加工,盖层优选地粘合到传感器表面以提供防漏密封,从而能够实现流体传导。优选的盖层材料包括硼硅酸盐玻璃、熔融硅石、熔融石英、石英或磷硅酸盐玻璃。可以在盖层中制作孔以提供到流体入口、流体出口和金属感测电极的通路。用于在玻璃晶片制作孔的典型方法是超声波蚀刻,它允许向玻璃基片的高度可控的图案转移。阳极键合法可随后用于把玻璃盖层键合到底层基片(例如,硅晶片)。两层的阳极键合提供了牢固且防漏的密封。

[0058] 具有这样的感测电极对115A、115B的示例性装置表示在图1中,即电极A和B。电流在被限制在流体通道105(例如,纳米通道)中的电解质溶液中以离子流的形式转移。电解质的作用在于在流体通道中保持均匀分布的电场。典型电解质溶液已被描述为把电泳应用于DNA分子的分离。最常见的用于DNA的电泳分离的电解质是Tris硼酸EDTA(TBE)和tris醋酸盐EDTA(TAE)。参见例如Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Press, 2001。然而,可使用任何导电介质。

[0059] 装置的操作

[0060] 在操作期间,通过把电势施加于宏观电极对(例如,位于流体通道105的相对端并与电解质溶液接触的电动势电极110、110')来提供恒定电流。电动势电极优选地与图1-4中表示的通向流体通道105的端部的线保持电气连通。可以沿流体通道105施加电势以在其中产生电泳力,从而使分析物125从流体通道105的第一端移位至流体通道的第二端。电动势电极可在流体通道105中产生恒定或振荡的电泳力以用于位于其中的分析物125的移位。电动势电极之间的电压可以恒定,或者它可以在测量的过程中变化。例如,一旦DNA分子已进入流体通道105并且在DNA分子进入到感测电极之间的体积之前,可能希望减小电压,以便使DNA分子缓慢穿过感测电极之间的体积。控制DNA分子穿过感测电极115A、115B之间的体积的速度允许DNA的多方面检测。

[0061] 作为感测电极的放置的例子,可以假设图1中的每个感测电极A和B宽度为20nm。电极A可以相对于电极B沿流体通道105移位例如10nm或30nm。从30nm到100nm或者从30nm到500nm或者从30nm到5 $\mu\text{m}$ 的感测电极之间的距离可被包括在单个装置中。对于足够长度的分析物,可以使用最多例如500 $\mu\text{m}$ 的距离,例如可以使用最多300 $\mu\text{m}$ 、200 $\mu\text{m}$ 或100 $\mu\text{m}$ 的距离。虽然可以加工其间具有任何距离的电极,但由于DNA难以具有大于500 $\mu\text{m}$ 的长度,所以在DNA的长度不超过500 $\mu\text{m}$ 的时候,任何大于500 $\mu\text{m}$ 的电极距离就是过多的。电极A和B之间的更小位移是这样的实施例的例子:虽然电极A和B相对于彼此移位,但存在电极的交迭。在一些实施例中,如图2中所示,在感测电极115A、115B之间可以没有交迭。

[0062] 感测电极115A、115B之间的电压与感测电极115A、115B之间的流体通道105中的局部阻抗成比例。电极的间隔由几个因素确定。感测电极对中的电极之间的距离越小,假设所有其它因素不变,则能够由感测电极对检测的颗粒越小。然而,加工极限可能使得难以按照很小的距离一致地放置成对的电极。因此,选择的距离是装置100的加工再现性和灵敏度之间的折衷。分离距离的选择以及由此电极是交迭还是不交迭取决于这些约束条件。

[0063] 所获得的感测电极115A、115B排列提供了用于分离电流和电压探针的装置并且能

够用于在流体通道中采用4点感测。在实施例中,位于流体通道105的端部的宏观电动势电极110、110'提供电流,而位于流体通道105两侧的纳米级感测电极115A、115B用于测量电压。电压电极优选地具有比正被测量的体积的阻抗高的输出阻抗。

[0064] 下面的计算表明了这种装置概念的可行性。流体通道可经受等于沿通道的长度的电势差除以通道的长度的恒定电场,即纵向施加于10 $\mu$ m长的流体通道的100mV导致100mV/10 $\mu$ m=10mV/ $\mu$ m或0.01mV/nm的电场。分开10nm的电极A和B之间的电势差则为电极之间的距离和该电场的乘积或者:

[0065]  $10\text{nm} \times 0.01\text{mV/nm} = 0.1\text{mV}$ 。

[0066] 类似地,当间隔为30nm时,0.3mV的电势差存在于电极A和B之间。利用常规电子测量工具可容易地检测到这些电势中的每个电势。当DNA分子或任何其它分析物穿过感测电极对时,感测电极之间的阻抗由于分析物和分子之间的电阻率差异而变化。在保持恒定电流的同时,测量所获得的电势的瞬时变化。

[0067] 对于图1中显示的例子,假设基本上恒定的速率,由感测电极115A、115B检测的每个电压脉冲的持续时间与穿过这两个感测电极之间的DNA或其它分析物125的长度成比例。在确定流体通道中的分析物125的速度之后,测量的脉冲的持续时间可用于计算在穿过感测电极之间的体积的同时分析物125移动的距离(速度 $\times$ 时间=距离),该距离将会等于分析物125的长度。

[0068] 很重要地,应该注意的是,通过沿流体通道105使横向电极之一移动10-50nm的距离并且使用直径大约10nm的流体通道105,分离这两个感测电极115A、115B的体积可视为具有与常规固态纳米孔的灵敏度相同的灵敏度。

[0069] 在使用中,感测电极对115A、115B之间的电压(例如, $V_{AB}$ )可由配置为测量感测电极对115A、115B之间的电势差的测量工具120(例如,电压表)感测。在优选实施例中,电压表120可以经由连接到通向感测电极的纳米线的金属接触垫与感测电极对中的每个感测电极115A、115B保持电气连通。

[0070] 通常,可以如下在流体通道105中检测分析物125。分析物(例如,生物聚合物链和探针)从室中转移到电解质溶液中的流体通道。典型地,可以由吸管、注射器或泵把电解质加入到流体通道。分析物样本尺寸可以根据实践的情况尽可能小,因为装置允许单分子的检测。流体可通过毛细管作用使流体通道变湿。可以利用原始电解质或者在通过吸入新溶液之后把分析物引入到微米级区域。可与一个或多个探针杂交的分析物(DNA)可以通过电势被引导至流体通道中。对于小的分析物,能够使用扩散、流体流动或电势。

[0071] 流体通道可具有不小于近似与分析物相同的宽度的宽度,并且可以足够大从而结合到分析物的大分子可以穿过流体通道。例如,可以从1nm到200nm的范围选择流体通道的宽度。流体通道可以足够深以允许结合到分析物的大分子穿过以及足够浅从而近似与分析物的尺寸相同。例如,可以从1nm到200nm的范围选择流体通道深度。可以选择流体通道的长度从而整个分析物被包含在流体通道中。

[0072] 在实施例中,感测电极和流体通道可以优选地布置使得在分析物进入感测电极之间的体积之前整个分析物进入流体通道。这种结构提供了这样的优点:减小了分析物对流体通道的电导率的影响。例如,如果在整个流体通道的电导率由于更多分析物进入流体通道而变化的同时开始测量感测电极之间的体积的电势的变化,则分析变得更加复杂。在优

选实施例中,当分析物存在于感测电极之间的体积时,它可以被完全包含在通道中。因此,流体通道的长度优选地具有近似为分析物的长度三倍的最小长度(假设感测电极之间的体积仅与分析物一样长,这是最小要求但不是最佳要求)。一条1kb的DNA的长度为大约330nm,因此流体通道的长度优选地为至少1 $\mu$ m长。适合利用所述方法分析的最长条的DNA可以为10巨碱基(Mb),这对应于至少10mm的优选流体通道。更优选地,通道的长度为分析物的长度的十倍,因此,通道长度的更优选的上限是100mm(10cm)。因此,优选地从1 $\mu$ m到10cm的范围选择流体通道长度。也可以采用更长和更短的流体通道长度。

[0073] 在一些实施例中,流体通道的结构可便于分析物进入到通道中,例如流体通道可包括一系列柱(例如,美国专利No.7,217,562,其全部内容通过引用包含于此)和/或漏斗形状。

[0074] 通过经把电势施加于位于流体通道的相对端并与电解质溶液接触的两个电动势电极提供的电流使分析物移过流体通道。电动势电极可在流体通道中产生恒定或振荡的电泳力以用于位于其中的分析物的移位。宏观电极之间的电压可以恒定,或者它可以在测量的过程中变化。例如,一旦DNA分子已进入流体通道并且在DNA分子进入到感测电极之间的体积之前,可减小电压,以便使DNA分子缓慢穿过感测电极之间的体积。

[0075] 可以监测反映感测电极对之间的电势的变化的电压信号。当分析物移过感测电极之间的体积时,电压信号改变。该信号可以在反映分析物(例如,探针目标复合物)的长度或没有探针的中间区域的长度的时间段期间升高或降低。典型分析物是非传导的并且将会阻碍电解质中离子的流动。因此,当分析物流经感测电极之间的体积时,电势和电压信号通常增加。在一些实施例中,例如对于低盐电解质和携带电荷的分析物,当分析物流经感测电极之间的体积时,电势和电压信号可减小。当包含杂交探针的分析物的部分移经感测电极之间的体积时,电压信号进一步改变。

[0076] 分析物长度和探针位置的确定

[0077] 在实施例中,提供了用于检测与生物聚合物杂交的探针的相对位置和/或生物聚合物的长度的方法。纳米孔可用于作用于确定杂交部位之间的距离的探测器,如美国专利公开No.2007/0190542 A1中所述,其全部内容通过引用包含于此。本文描述包括电压探测器的纳米通道装置的构造。在纳米孔和流体通道(例如,纳米通道)中,从当生物聚合物移经纳米孔或流体通道时第一杂交位置和随后杂交位置的检测之间的时间可推断目标生物聚合物上的杂交部位之间的距离。本文公开的技术允许确定生物聚合物长度和杂交位置之间的距离。

[0078] 特别地,如本文中所使用,“探针”是指能够序列特异共价或非共价结合到目标分子的任何分子或分子的组合体。探针可以是但不限于DNA序列、RNA序列、抗体或抗体片段。术语“核苷酸”和“碱基”可互换地使用并且指示由磷酸基团、糖和能够构成DNA或RNA多核苷酸链或股的五种含氮碱基之一组成的分子。对于DNA,含氮碱基包括胞核嘧啶(C)、腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)和胸腺嘧啶(T)并且糖是2-脱氧核糖。对于RNA,脱氧核糖由替代脱氧核糖的核糖和替代胸腺嘧啶碱基(T)的尿嘧啶碱基(U)取代。

[0079] DNA探针“库”是包括大量可能的置换序或者可能包括所有可能的置换序的固定长度的DNA探针的集合。多个探针可以由具有相同序列选择性的同一探针的多个拷贝构成或者由具有不同序列选择性的两个或多个探针构成。“探针图谱”是指包含与探针优先结合的

沿目标序列的部位相关的信息的数据集。当序列选择探针的整个长度结合到目标生物分子的长度的一部分时,产生部分杂交生物分子。该数据集可包括参考已知序列的绝对位置信息、与结合部位之间的距离相关的相对信息或者二者。该数据集可存储在计算机介质中。在美国专利公开No.2009-0099786 A1中可找到探针和光谱图的特性的进一步细节,其全部内容通过引用包含于此。

[0080] “目标”(即,分析物)是将要使用本发明的实施例确定其长度、特性或序列信息的生物聚合物。分析物可以是生物聚合物,诸如脱氧核糖核酸、核糖核酸、蛋白质或多肽。目标DNA可以是单链或双链的。在一些实施例中,分析物是已杂交了探针的生物聚合物。

[0081] DNA是包含生命过程中所需的所有基因组信息的基本分子。RNA分子在称为转录的过程中形成为DNA链的互补拷贝。然后在称为转译的过程中基于RNA模式由氨基酸形成蛋白质。在这些分子中的每个分子中能够找到的共同关系是:它们都是使用基于所获得的生物聚合物最终工作的最后目的按照各种序列串在一起的一小群构件(诸如,碱基或氨基酸)构造的。

[0082] 例如,如美国专利公开No.2007/0190542中所公开的那样准备用于分析的分析物,其全部内容通过引用包含于此。参照图5,示意性地描述了DNA分子500,并且可看到DNA分子500构造为彼此反平行地定位的两个链505、510。这两个相对链505、510中的每个链顺序地由重复的多组核苷酸515形成,其中每个核苷酸515包括磷酸基、2-脱氧核糖和四种含氮碱基之一。含氮碱基包括胞核嘧啶(C)、腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)和胸腺嘧啶(T)。DNA链505按照从所谓5'或“五撇”端到所谓3'或“三撇”端的特定方向被读取。类似地,如图6中示意性所述,RNA分子600是多核苷酸链,它与DNA 500的链的区别在于它具有替代脱氧核糖的核糖和替代胸腺嘧啶碱基(T)的尿嘧啶碱基(U)。

[0083] 传统上,当在这些有机分子中确定碱基515的特定排列并由此确定分子的序列时,使用称为杂交的过程。杂交过程是两个遗传序列彼此的会合或结合。这个过程是可预测的过程,因为分子中的碱基515彼此不共享相同的亲和性。T(或U)碱基喜好与A碱基结合,而C碱基喜好与G碱基结合。通过存在于相对碱基对之间的氢键促成这种结合。例如,在A碱基和T(或U)碱基之间存在两个氢键,而在C碱基和G碱基之间存在三个氢键。

[0084] 随后用于在关注的分子中确定和识别这些碱基515的序列的主要工具是杂交寡核苷酸,通常称为探针700。如图7中所示,DNA探针700是具有已知长度和序列构成的DNA序列。探针700可以具有取决于它们包括的碱基515的数量的任何长度。例如,包括六个碱基515的探针700称为6-mer,其中探针700中的六个碱基515中的每个碱基可以是已知四种天然碱基类型A、T(U)、C或G中的任何一种,替代地可包括非天然碱基。在这个方面,库中的探针700的总数取决于每个探针700内包含的碱基515的数量并且由公式 $4^n$ (4的n次幂)确定,其中n等于每个探针700中的碱基515的总数。因此,探针库的尺寸的一般表达表示为 $4^n$  n-mer探针700。为了说明的目的,在6-mer探针的情况下,可能的唯一可识别探针组合的总数包括 $4^6$ (4的6次幂)或4096个唯一6-mer探针700。还应该注意的是,包括非天然碱基允许产生按照扩展探针识别的库的范围的通用性的方式在其中具有空格或通配符的探针。也可以使用包括与天然碱基组成模式的通用碱基的探针,例如美国专利No.7,071,324、No.7,034,143和No.6,689,563中描述的探针,其全部内容通过引用包含于此。

[0085] 当在适当条件下利用序列选择探针培养目标生物分子(诸如,单链DNA)时,探针在

特定部位杂交或结合到该生物分子。确定杂交部位的相对位置对于构造目标生物分子的图谱和识别目标分子而言很有用。

[0086] 当待分析的生物聚合物是双链DNA 500时,如图8中所述的使用探针700的杂交的过程首先要求在称为变性的过程中准备生物聚合物链。变性是通常通过应用热量或化学品完成的过程,其中原始双链DNA的两个链之间的氢键断裂,留下单链DNA,该单链DNA的碱基可用于氢键结合。在生物聚合物800变性之后,把单链探针700引入到生物聚合物800以定位生物聚合物800的具有与探针700中发现的序列互补的碱基序列的部分。为了使生物聚合物800与探针700杂交,变性的生物聚合物800和具有已知序列的多个探针700都被引入到溶液中。溶液优选地是离子溶液,更优选地是含盐溶液。搅动该混合物以促进探针700沿其具有匹配的互补序列的部分结合到生物聚合物800。一旦生物聚合物链800和探针700已杂交,链800被引入到测序装置的一个室内。本领域技术人员还应该理解,尽管可以在把生物聚合物链800所述室内之前完成杂交,但也可以在这些室中的一个室中执行杂交。在这种情况下,在把变性的生物聚合物加入到cis室之后,还把包含具有已知序列的探针700的一滴缓冲溶液加入到cis室并且在杂交的生物聚合物移位之前使其与生物聚合物800杂交。

[0087] 作为分析物制备的特定例子,在存在探针的选择的情况下并且在50mM氯化钾和10mM Tris-HCl的缓冲溶液(pH 8.3)中,可以把核苷酸样本(诸如,DNA或RNA)加热到变性温度,对于DNA而言通常大于90℃并且对于RNA而言通常在60-70℃之间。可以在cis室中或者在把分析物放入该室中之前完成杂交。核苷酸链和探针的混合物随后冷却以允许引物结合,温度取决于探针的长度和构成。例如,6-核苷酸探针将会冷却到室温或更低。在穿过流体通道以进行分析之前,可以允许核苷酸链和探针在低温退火达5分钟。在没有不适当的实验的情况下,本领域技术人员可以容易地确定精确的温度。

[0088] 参照图1,在一些实施例中,当分析物125(例如,生物聚合物)位于流体通道中时,与感测电极115A、115B之间的体积对应的电信号由感测电极115A、115B检测。当生物聚合物进入感测电极之间的体积时,记录电信号的变化。参照图10,当分析物进入感测电极之间的体积时,电信号在时间点 $T_1$ 线性增加。当感测电极之间的体积被完全填满时,该信号保持基本恒定。当分析物离开感测电极之间的体积时,该信号在时间点 $T_4$ 返回到基线。感测电极构造为连接到用于捕捉与感测电极之间的体积对应的电信号的测量工具(例如,电压表)。由测量工具捕捉的电信号可以由数据收集装置(例如,斯坦福研究仪器SIM970电压表)记录为时间的函数。可记录电压信号变化之间的时间间隔。基线上方的电压信号的变化持续时间可指示分析物的存在。如图9中时间点 $T_2$ 和 $T_3$ 之间所示的基线上方的另一增加可指示与分析物杂交的探针的存在。由于噪声以及长的分析物(诸如,DNA)中通常具有小的弯曲部分的事实,电信号可具有波动。当具有弯曲的部分进入到感测电极之间的体积时,电信号可稍微增加,然后当该弯曲部分离开感测电极之间的体积时,电信号可稍微减小。因此可能需要电信号的校准以确定长度。为了确定分析物的长度,可以利用一个或多个标准品(例如,具有已知不同长度的生物聚合物)校准该系统以确定每个生物聚合物长度的脉冲持续时间和速度。在一致的电压和电解质条件下,这种数据可用于产生使分析物的脉冲持续时间与其长度关联的标准曲线。

[0089] 类似地,电压信号的变化持续时间可用于确定第一多个探针的杂交的位置和生物聚合物上的两个探针之间的距离。通过使用感测电极可以检测与流体通道的感测电极之



间的体积对应的检测的电信号。如图9中时间点 $T_1$ 所示,电信号最初可在生物聚合物移经感测电极之间的体积时变化,并且当生物聚合物的包括杂交探针的部分移经感测电极之间的体积时在 $T_2$ 进一步变化。检测的电信号可指示沿生物聚合物的杂交探针的位置。可分析电信号的变化和变化的持续时间以确定沿生物聚合物的长度的具有已知序列特异性的探针的位置。探针之间的距离可基于代表杂交探针的电压尖脉冲之间的持续时间,就如同尖脉冲的持续时间用于确定生物聚合物长度一样。例如,当确定杂交探针之间的距离时,可以考虑电压信号的平均值。如果异常值在很大程度上偏离对于同一分子获得的其它测量结果,则可以排除这些异常值。可以以视觉方式或者借助执行本文描述的分析的计算机程序来完成这种分析。

[0090] 探针之间的距离的计算可如下用于确定生物聚合物的序列。可以通过使具有已知序列的第一多个探针与生物聚合物杂交来制备分析物,从而第一多个探针附接到生物分子的各部分以产生部分杂交的生物分子。分析物可布置在流体通道中。可沿流体通道施加电势以产生电泳力,从而分析物从流体通道的一端移位到流体通道的另一端。如上所述,电压的变化用于检测杂交的探针。

[0091] 通过检测第一多个探针的杂交,可以确定生物聚合物的序列的至少一部分。通过使用从生物聚合物的端部到探针的杂交部位的距离或者从探针的杂交部位到另一探针的杂交部位的距离,可以确定生物聚合物上的探针的位置。计算机算法可用于处理电信号以帮助确定生物聚合物的序列。

[0092] 在一些实施例中,在第一探针之后或者与第一探针并行地,可以把具有用于目标分子上的识别部位的特异性的第二多个探针与生物聚合物杂交以形成多个杂交,并且可以对随后的多个探针重复进行检测、分析和确定步骤。

[0093] 生物聚合物可包括双链生物聚合物目标分子。通过使生物聚合物(即,目标分子)与具有用于目标分子的识别部位的第一探针特异性的第一探针接触以形成第一多个局部三元复合物,可以制备分析物。

[0094] 电信号可用于检测和记录生物聚合物的复合和未复合的区域以创建第一多个探针的第一探针图谱和针对随后每组多个探针的随后的探针图谱,第一探针图谱和随后的探针图谱中的每个探针图谱包括关于杂交的第一多个探针和随后每组多个探针的相对位置的信息。每个探针图谱可包括指示探针之间的距离的一系列数字。这些数字可指示以碱基对计量的距离或以纳米计量的距离。通过使用位置信息和/或交迭探针结合序列和位置信息的组合整理至少两个探针序列,可以确定针对生物聚合物的至少一部分的候选序列。

[0095] 第一探针图谱和第二探针图谱可包括关于每个探针的位置信息的误差的信息。例如,每个指示的距离可具有关联的标准差,如 $100\text{nm} \pm 10\text{nm}$ 。另外,通过使用下面内容的至少一项整理至少两个探针序列可以确定候选序列:(i)位置信息和与位置信息的误差相关的参数或(ii)探针分子的交迭序列和位置信息以及位置信息的误差的组合。

[0096] 在序列号为12/243,451的美国专利申请中进一步讨论了通过探针的杂交形成三元复合物来实现生物聚合物的测序,其全部内容通过引用包含于此。在Gracheva, M.E.; Xiong, A.; Aksimentiev, A.; Schulten, K.; Timp, G.; Leburton, J.-P. Simulation of the electric response of DNA translocation through a semiconductor nanopore-capacitor, *Nanotechnology* 2006, 17, 622-633; 和 Zwolak, M.; Di Ventra, M. Physical



approaches to DNA sequencing and detection, Rev. Mod. Phys. 2008, 80, 141-165 中可找到关于检测/测序的另外的背景信息, 其全部内容通过引用包含于此。

[0097] 长度确定的例子

[0098] 包括两个微流体室、连接这两个微流体室的一个或多个流体通道和沿每个流体通道的长度布置的感测电极对的感测装置充满了离子流体。通常, 该流体可以是包含盐的水。

[0099] 未知长度的DNA的片段的多个拷贝可以被引入到连接到包含感测电极对的流体通道的微流体室之一。宏观电极用于使DNA链以电泳方式从微流体室移动到一个或多个流体通道。当DNA进入流体通道时, 它呈现线性形态。它线性化的程度取决于许多因素。这些因素中的一些因素为例如DNA链的持续长度、温度、离子条件以及流体通道的宽度和深度。

[0100] 由电动势电极施加的电势导致DNA链沿流体通道的长度移动。当片段沿流体通道移动时, 它穿过感测电极之间的体积。当DNA的前缘进入感测电极之间的体积时, 可记录两个感测电极之间的某一电气特性(诸如, 横向通道电流或电势)的变化。记录的信号包括时间戳和电势或其它电气性质的变化的指示。也可以记录该电气性质的值。可以用背景信号减去该值或者该值可以是绝对值。可以由计算机产生列出感测电极之间的体积中发生的所有响应和每个响应的的时间戳的表。计算机程序可随后确定信号的持续时间。当DNA链的后缘离开感测电极之间的体积时, 电气响应通常返回到在DNA进入该体积之前观测到的值。电气响应的大小取决于实验设置; 优选地, 电气响应等于系统的均方根噪声的大小的至少3倍。

[0101] 可以把校准的标准曲线应用于测量的长度以便计算分析物的真实长度。例如, 可以利用在与该分析物相同的条件下(例如, 离子强度、温度、pH)以电泳方式穿过流体通道的一系列已知长度的DNA片段校准该装置。这些片段优选地跨越足够的不同长度以覆盖在实验中可能用于测量未知片段的长度的范围。

[0102] DNA测序的例子

[0103] 可以使已知或未知序列的目标DNA变性。通常通过应用热量或化学品完成双链体DNA的变性, 从而成对的链之间的氢键断裂。利用已知序列和基线长度的探针培养变性的DNA样本, 或者分割变性的DNA样本以便利用多个探针进行培养, 每个探针具有它们自己的在目标DNA上的特异识别序列。为了把一个探针或多个探针杂交到它们的一个识别序列或多个识别序列, 选择培养的条件以使得一个探针或多个探针优先于其它部位或不匹配部位结合到已知的特异识别部位。还选择条件以使得与未结合的探针结合部位相比, 变性的DNA链上的探针结合部位中的更多的探针结合部位结合到探针。溶液可以是缓冲离子溶液。可以搅动溶液以促进探针的结合。溶液的温度可以在培养期间变化。例如, 培养的温度可以在杂交过程期间缓慢冷却。

[0104] 一旦变性的目标DNA已与一个探针或多个探针杂交, 该样本被引入到位于流体通道装置一端的微流体室。流体通道装置充满了离子溶液, 例如盐溶液。该溶液也可以被缓冲。在把样本引入到微流体室之前, 可以去除过多的探针。凝胶过滤是用于从较长链的DNA去除短探针的一种方法。替代地, 可使用其它商业上可获得的净化方法。一旦具有杂交的探针的目标DNA链已被引入到微流体室, 经由电动势电极施加电势以将该DNA从微流体室驱动到一个或多个流体通道。

[0105] 当进入流体通道时, 目标DNA通常呈现线性化形态。流体通道越窄, 迫使DNA线性化的程度越大。施加于宏观电动势电极的电压以电泳方式沿流体通道驱动该DNA。当DNA和杂

交的探针沿流体通道移动时,它们进入流体通道中的感测电极之间的体积。

[0106] 在不存在DNA的情况下,感测电极之间的体积可仅包含离子溶液并且具有在两个感测电极之间测量的基线电势差。当DNA进入感测电极之间的体积时,这两个感测电极之间测量的电势变化,因为DNA具有与离子溶液的电导率不同的电导率。当DNA进入感测电极之间的体积时,这两个感测电极之间的通道的电导率通常相对于在感测电极之间仅存在离子流体时的电导率减小。当还具有杂交到其上的探针的DNA的部分进入感测电极之间的体积时,该电势进一步变化。

[0107] 当分子穿过感测电极之间时,监测的电压改变可检测的并且可测量的量。电极检测并记录这种电压的变化作为时间的函数。这些电压的变化是在任何给定时间正在穿过感测电极之间的分子的相对直径的结果。例如,具有杂交到其上的探针的生物分子的部分是未杂交并因此没有探针的生物分子的部分的直径的两倍。

[0108] 这种穿过感测电极之间的生物分子的体积的相对增加引起感测电极之间的电阻的临时增加,从而导致可测量的电压变化。当生物分子的包括探针的部分穿过感测电极之间时,进一步阻碍了电流,从而在结合部分穿过期间在记录的电压中形成相对尖脉冲,该尖脉冲在杂交部分穿过之后再次减小。感测电极检测并反映监测的电流的这些变化。另外,测量电压变化的测量结果并将其记录为时间的函数。结果,电阻的周期性中断或变化指示作为相对或绝对位置的函数已知探针序列在哪里附接于生物分子。

[0109] 当DNA或目标DNA上的探针进入流体通道时,记录电信号。该电信号包括时间戳和变化的电气性质的值。可以用背景信号减去该电气性质值或者该电气性质值可以是绝对值。可以由计算机产生列出感测电极之间发生的所有响应和每个响应的的时间戳的表。计算机程序可随后确定生物聚合物的长度和生物聚合物上的杂交探针的位置。生物聚合物上的探针的位置可以按照纳米、碱基对或总的生物聚合物长度的百分比来确定。

[0110] 生物聚合物上的探针的位置能够根据它与生物聚合物的端部的距离来确定。通过使用校准的标准确定生物聚合物的总长度可以完成这一点。可以把生物聚合物信号的持续时间与校准的标准曲线比较以便计算分析物的真实长度。例如,可以利用在与分析物相同的条件下(例如,离子强度、温度、pH)以电泳方式穿过流体通道的一系列已知长度的DNA片段校准该装置。这些片段优选地跨越足够的不同长度以校准感测电极从而测量未知片段的长度。

[0111] 通过利用第二多个探针的随后或者并行的杂交能够确定更多序列,并且可以对随后的多个探针重复进行检测、分析和确定步骤。本文描述的设计融合了纳米孔和流体通道技术并且对驱动电泳力和检测的信号去耦。与先前几何形状的情况相比,通过使用电压感测并且通过直接在放置感测电极的基片上加工电压放大器,该装置可工作于更高的频率。

[0112] 所描述的本发明的实施例仅是示例性的,许多变化和修改对于本领域技术人员而言将会是清楚的。所有这些变化和修改落在所附权利要求定义的本发明的范围内。

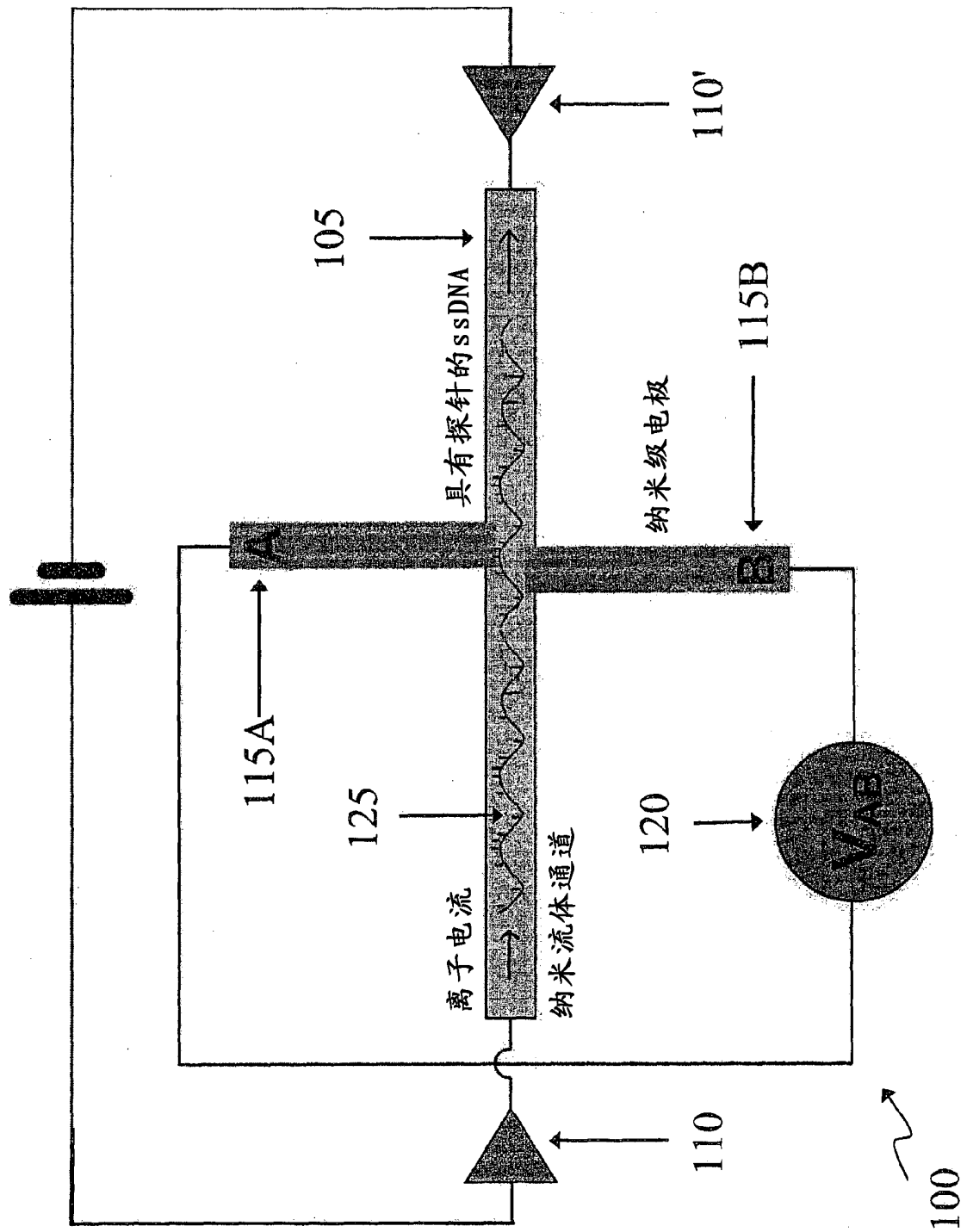


图1

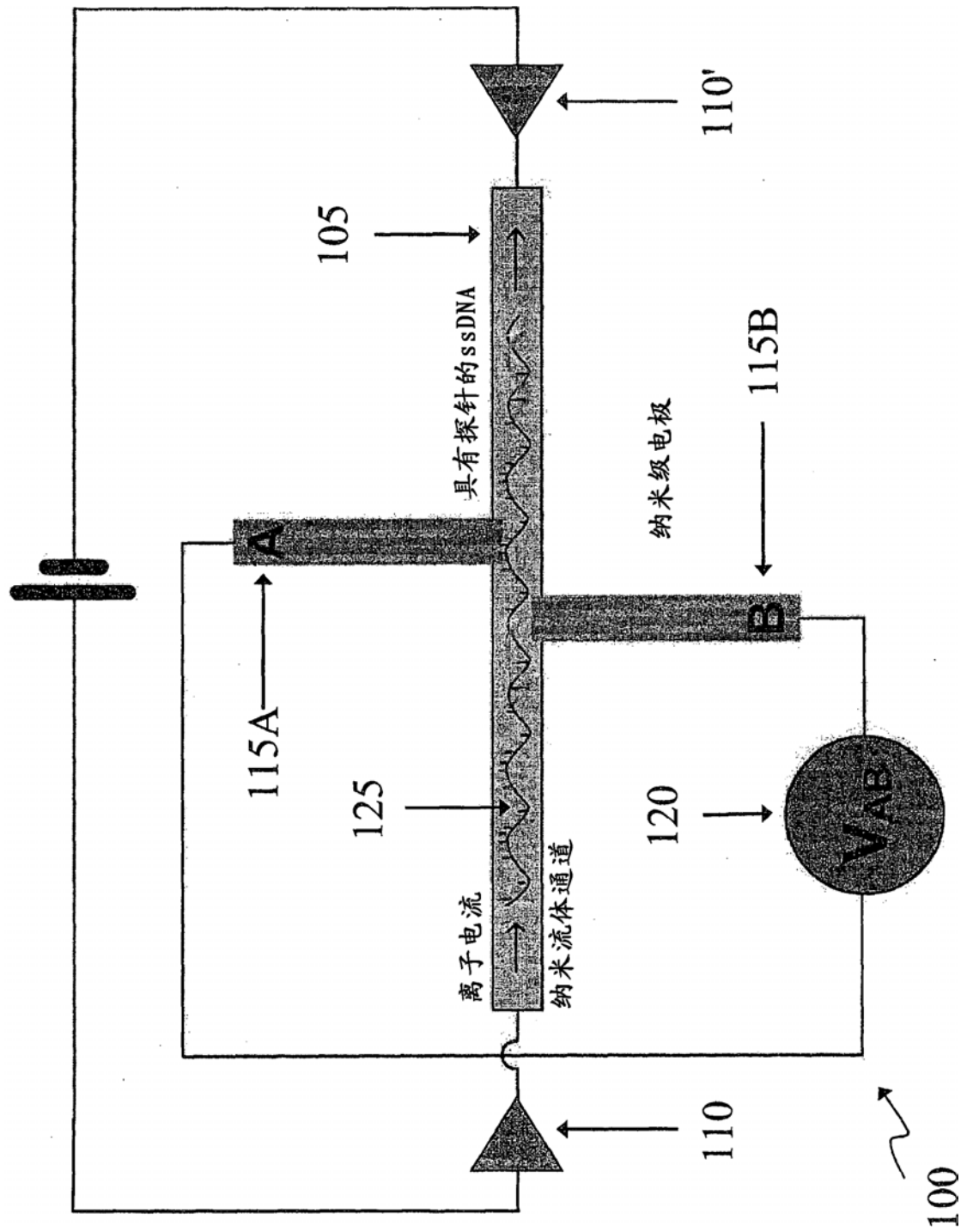


图2

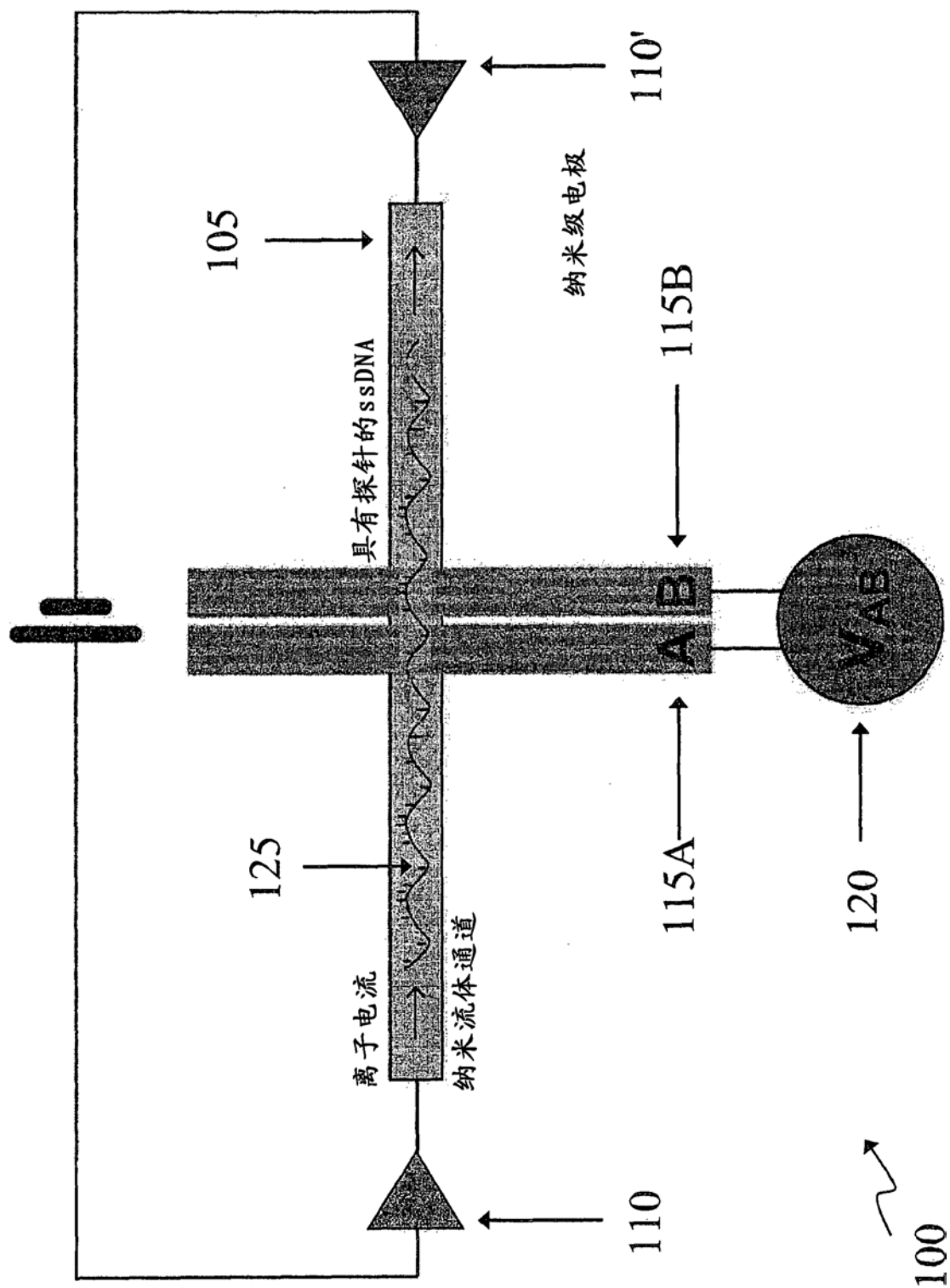


图3

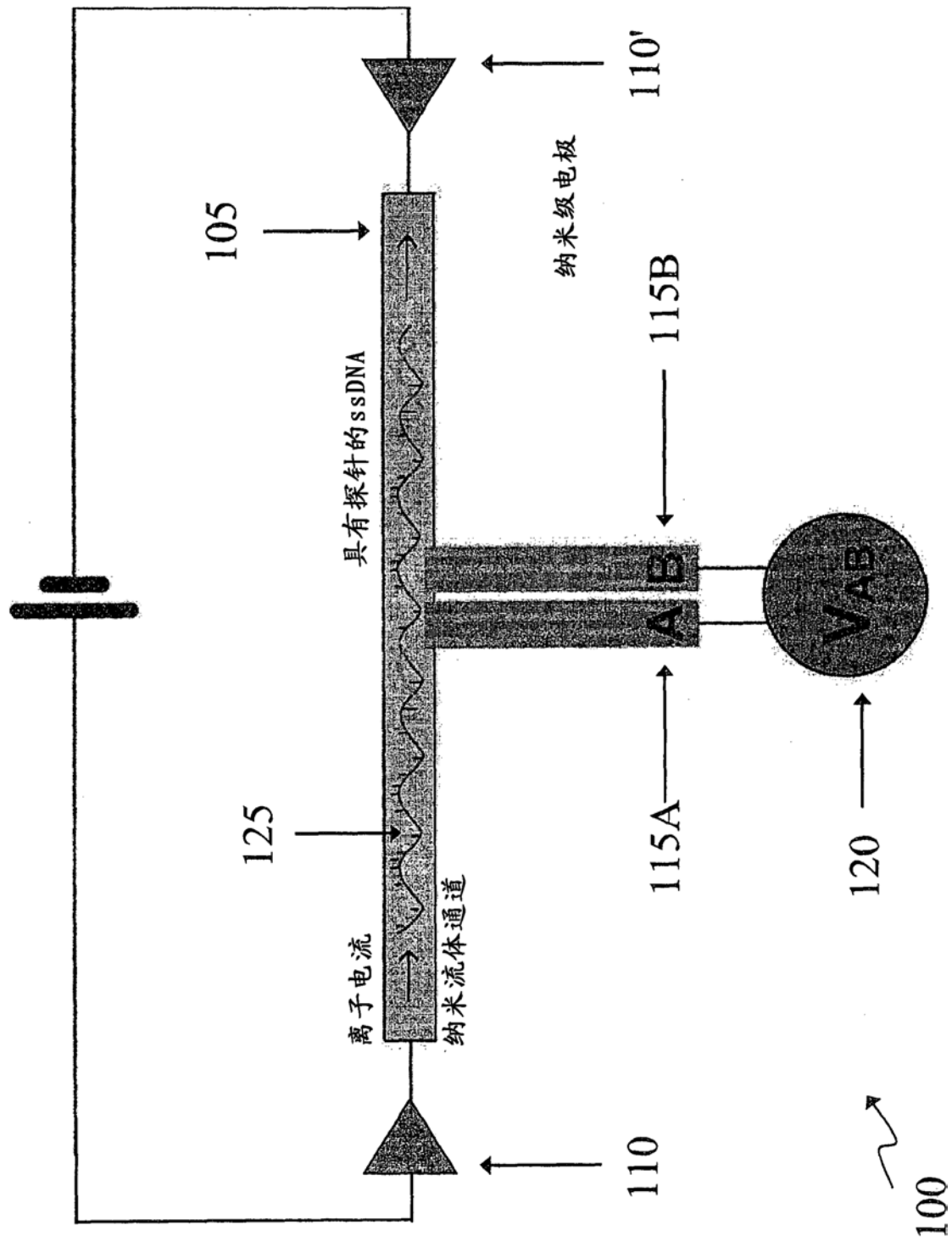


图4

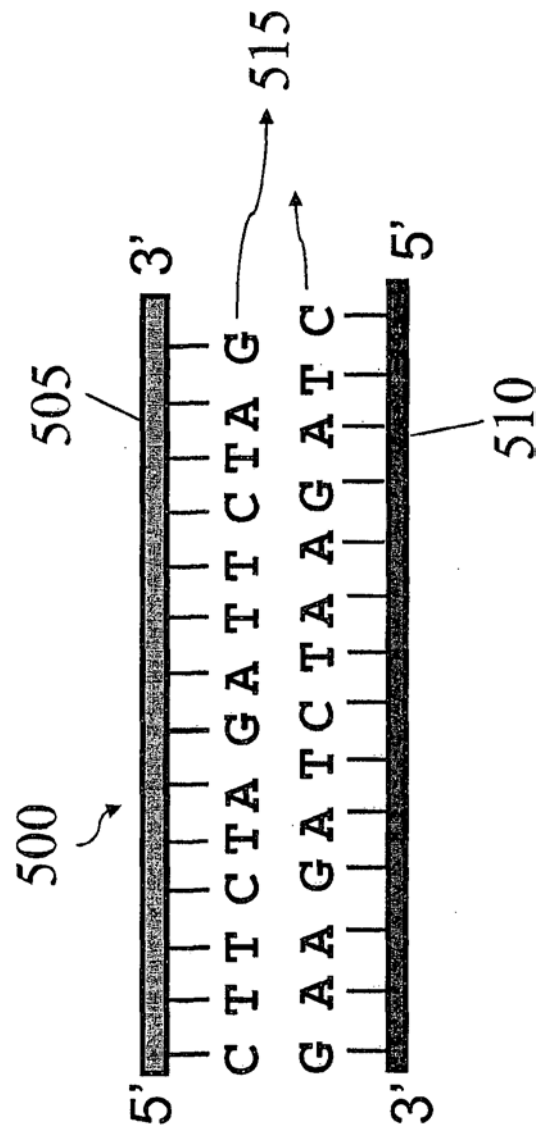


图5

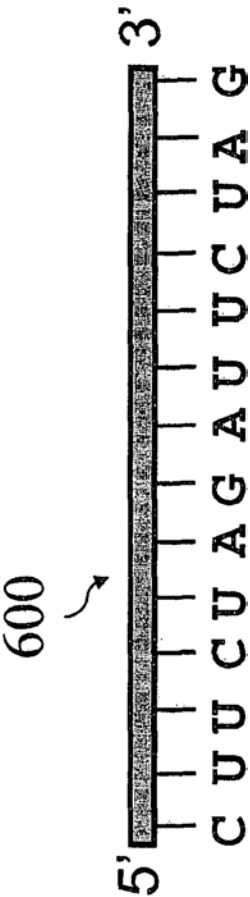


图6

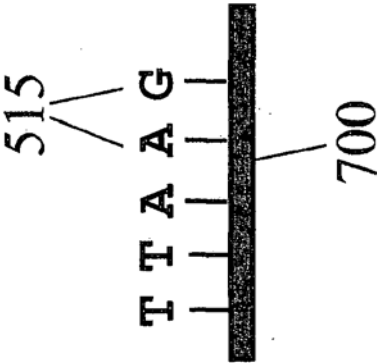


图7



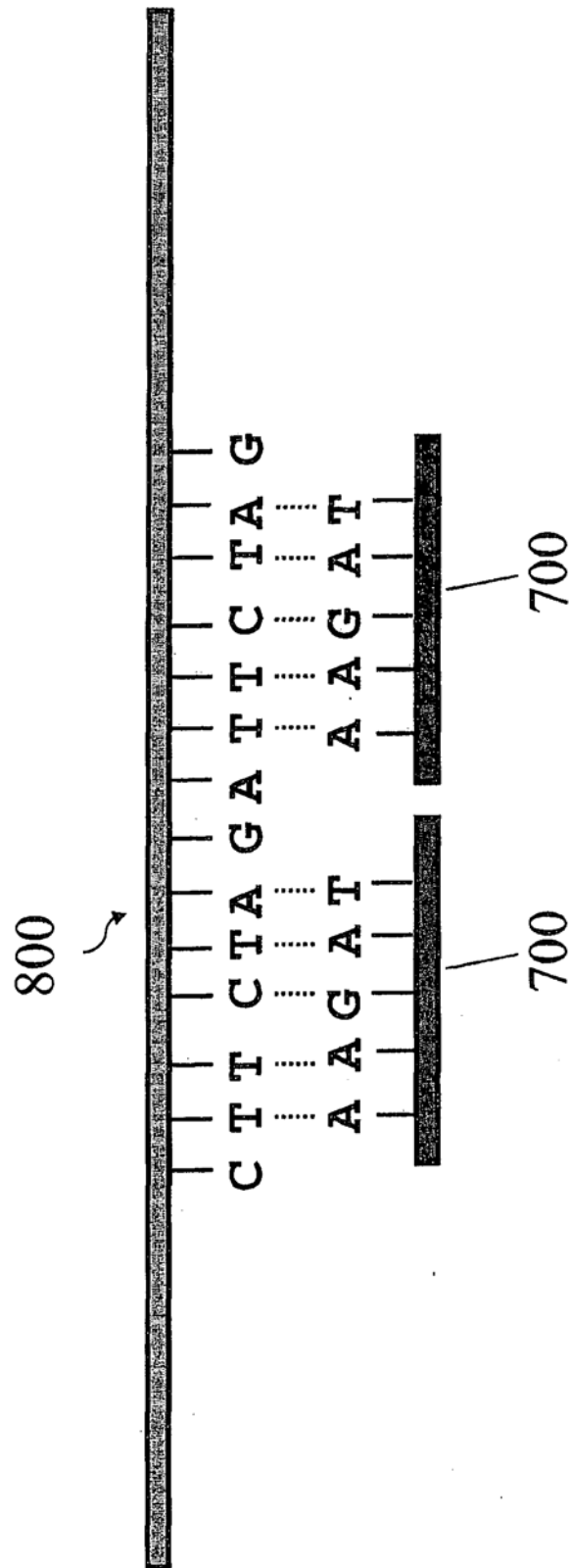


图8

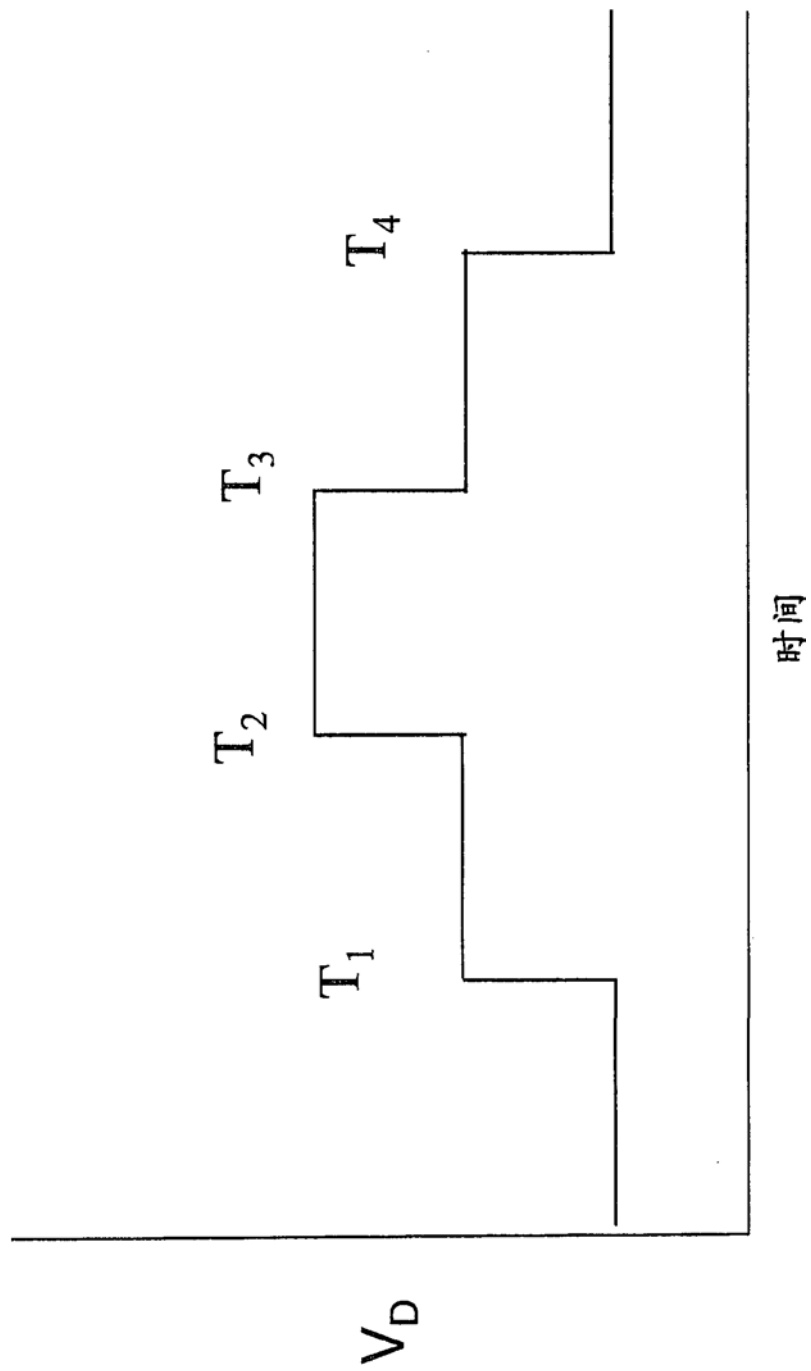


图9