



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109569458 B

(45) 授权公告日 2021.09.21

(21) 申请号 201811306456.5

(22) 申请日 2013.10.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109569458 A

(43) 申请公布日 2019.04.05

(30) 优先权数据
1313121.4 2013.07.23 GB
61/718,899 2012.10.26 US

(62) 分案原申请数据
201380068197.6 2013.10.23

(73) 专利权人 牛津楠路珀尔科技有限公司
地址 英国牛津

(72) 发明人 安德鲁·约翰·赫伦
克莱夫·加文·布朗
詹森·罗伯特·海德

佩德罗·米格尔·奥尔蒂斯·巴阿
蒙

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 张英 沈敬亭

(51) Int.Cl.
B01J 19/00 (2006.01)
B01J 3/00 (2006.01)
C12Q 1/6837 (2018.01)
G01N 33/573 (2006.01)

审查员 李凤喜

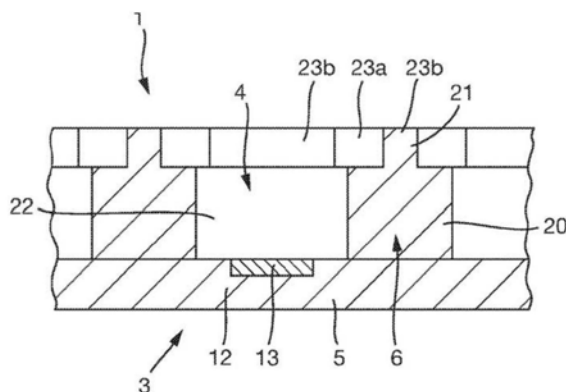
权利要求书2页 说明书43页
序列表6页 附图51页

(54) 发明名称

用于形成含极性介质的体积的阵列的装置

(57) 摘要

本发明涉及一种用于形成含极性介质的体积的阵列的装置。一种包含两亲性分子的膜阵列使用包含限定区室阵列的支撑物的装置而形成。包含极性介质的体积提供于各个区室内并且提供含非极性介质的层延伸通过具有所述体积的开孔。极性介质流过所述支撑物以取代非极性介质并与所述体积接触形成层,在所述界面上形成含两亲性分子的膜。在所述装置的一种构造中,所述支撑物包含的分隔件含有内部部分和外部部分。所述内部部分限定其间无能够阻止包含容纳于邻近的内部凹陷内的极性介质的体积彼此接触的间隙的内部凹陷。所述外部部分从所述内部部分向外延伸并具有容许非极性介质流过所述基底的间隙。



1. 一种用于形成含极性介质的体积的阵列的装置,所述装置包含:

支撑物,所述支撑物包含限定具有通过其引入极性介质的开孔的区室阵列的分隔件,所述分隔件包含内部部分和外部部分,所述内部部分限定其间无间隙的内部凹陷,形成区室的内部部分并且能够阻止容纳于邻近的内部凹陷内的含极性介质的体积相互接触,以及所述外部部分从所述内部部分向外延伸并具有容许非极性介质通过间隙在区室之间流动的所述间隙,其中所述分隔件的外部部分从所述内部部分向外延伸,并且限定所述区室的外部部分;以及

在每个内部凹陷中提供的电极,

其中所述内部凹陷和所述外部部分之一或两者所具有的表面具有经过布置以保留非极性介质的图案。

2. 根据权利要求1所述的装置,其中所述外部部分是从所述内部部分延伸的立柱。

3. 根据权利要求1所述的装置,其中所述外部部分当朝向所述开孔观察时从所述内部凹陷的边沿向后延退。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述内部凹陷所具有的表面具有经过布置以保留非极性介质的图案。

5. 根据权利要求4所述的装置,其中所述图案包含多个从所述内部凹陷向外延伸的凹口。

6. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述外部部分所具有的表面具有经过布置以保留非极性介质的图案。

7. 根据权利要求6所述的装置,其中所述图案包含多个从所述区室的内部部分向外延伸的凹口。

8. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述支撑物包含基座以及所述分隔件从所述基座延伸,以及所述分隔件的内部部分通过从所述基座延伸的共同本体形成。

9. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述凹陷的内端是平面表面。

10. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述分隔件的内部部分从所述开孔观察时具有非圆形的轮廓,其围绕各个区室包含一个或多个用于限制含极性介质的体积的凸出部分和一个或多个提供容许通过含极性介质的体积进入所述区室替换出非极性介质流出的通道的凹进部分。

11. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述分隔件的内部部分从所述开孔观察时具有围绕各个区室呈圆形的轮廓。

12. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述分隔件的外端共面延伸。

13. 根据权利要求12所述的装置,其中共面分隔件外端边沿的每区室的总长度大于所述区室中能够容纳的最大理论球体的最大周长。

14. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述内部凹陷能够包含具有的平均体积范围为0.4pL~400nL的含极性介质的体积。

15. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述内部凹陷能够容纳含极性介质的单个体积。

16. 根据权利要求1~3中任一项所述的装置,其中所述内部凹陷含有极性介质的相应体积。

17. 根据权利要求16所述的装置,进一步包括延伸穿过所述支撑物与所述含极性介质的体积接触的含非极性介质的层。

18. 根据权利要求16所述的装置,进一步包括延伸穿过所述支撑物的含极性介质的层,其中非极性介质包围所述分隔件的外部部分以及极性介质的层与所述含极性介质的体积接触,含两亲性分子的膜形成于含极性介质的层和所述含极性介质的体积之间的界面上。

19. 根据权利要求18所述的装置,进一步包括与含极性介质的层电接触的共用电极。

20. 根据权利要求19所述的装置,其中在每个内部凹陷的基座处提供电极。

21. 根据权利要求20所述的装置,其中将提供于每个内部凹陷的基座处的电极连接至电路。

22. 根据权利要求18所述的装置,其中所述膜包含离子通道。

23. 根据权利要求22所述的装置,其中所述离子通道是用于确定多核苷酸序列的纳米孔。

24. 根据权利要求18所述的装置,其中所述含两亲性分子的膜是聚合的。

25. 根据权利要求24所述的装置,其中所述膜是三嵌段共聚物。

26. 根据权利要求18所述的装置,其中所述极性介质的体积包括氧化还原电偶。

27. 根据权利要求20所述的装置,其中所述电极是Ag/AgCl参考电极。

28. 根据权利要求1-3中任一项所述的装置用于确定核苷酸序列的用途。

用于形成含极性介质的体积的阵列的装置

[0001] 本申请是申请日为2013年10月23日的题为“膜阵列的形成及其装置”的中国专利申请No.201380068197.6的分案申请。

技术领域

[0002] 在一些方面中,本发明涉及使用极性介质体积阵列形成包含两亲性分子的膜阵列。一个进一步的方面涉及适用于形成膜阵列的装置。在其它方面中,本发明涉及极性介质体积阵列的形成。极性介质的这种体积阵列可以用于一定范围的应用,包括包含两亲性分子的膜的形成。

背景技术

[0003] 在纳升至皮升范围内空间上限定的流体小体积阵列可以用于广泛的范围的生物,医药和其它分析应用中。小液滴阵列提供了有助于单个小液滴或小液滴组群的小体积的高通量处理的机会,并可以用于例如分区反应(compartmentalise reaction),细胞分选和筛选应用,如蛋白质结晶,血液或脊髓液的分析 and 废物处理。阵列中流体的体积的寻址(address)和替换的能力是一个重要的方面,例如用于实施所述体积上的反应和补充所述阵列。微流体静止小液滴阵列公开于Lab Chip,2011,11,3949中。

[0004] 脂质双层是由两层脂质分子形成极性薄膜。脂质双层发现于大多数活体生物的细胞膜中,通常由磷脂构成。它们对于大多数亲水性分子和离子是不可渗透的,并能够使细胞使用已知为离子泵的跨膜蛋白通过将离子泵送穿过所述脂质双层来调节其盐的浓度和pH值。脂质双层,或更一般地双层两亲性分子,也可以作为实验研究范围内的优良平台。Holden等人(Holden et al,J.Am.Chem.Soc.2007,129,8650-8655)公开了含有提供于小液滴之间的脂质双层的水性小液滴的功能性生物网络的形成。这种网络通过将泵,通道和孔引入所述双层中而充当光传感器,电池和电气元件的作用。Sackmann(Sackmann,Science,New Series,Vol 271,No.5245 (Jan 5,1996),pp.43-48)提供了支撑脂质-蛋白双层的科学和实践应用的综述,包括其在电光学生物传感器中的用途。Jung等人(Jung et al,J.Am.Chem.Soc,2009,131(3),1006-1014)已经开发出用于检测在支撑双层上结合的蛋白配体的光学测定法。

[0005] 在疏水介质如油中的水溶液的两个小液滴之间形成两亲性分子膜的能力已经在W0-2008/012552中得到证实。每个小液滴含有的两亲性分子层包封于亲水性介质中,所述小液滴提供于疏水介质中。使所述小液滴接触以形成其间的两亲性分子的膜。电极可以提供于每个小液滴亲水性内部,以测定跨过所述双层的离子流。小液滴阵列可以提供于具有单个小液滴可以驻留的微机械加工微凹坑(micromachined dimple)阵列的容器中。

[0006] 另一个公开于W0-2009/024775中的应用是在阵列中的亲水性介质体积和通过与亲水性介质的所述体积接触的水化支撑物形成的亲水性介质的层之间形成两亲性分子的膜。此文献公开了一种用于产生小液滴界面双层的方法,其中小液滴通过用水溶液接触油/脂质溶液而制备,并使所得的水溶液的小液滴接触水性琼脂糖凝胶支撑层。

[0007] 理想的是使用两亲性分子的膜固定膜蛋白。将离子通道纳米孔提供于高阻抗性的两亲性双层中进行DNA检测,先前已有文献进行了充分记载。水溶液提供于两亲性双层任一侧并且通过纳米孔的离子流动发生于电位梯度下。可以促使DNA移位所述孔并且在DNA通过所述孔移位期间离子流的变化可以进行测定以确定其核苷酸序列。所述脂质双层可以通过本领域中公知的方法,例如膜片钳夹(patch clamping)或涂色(painting)悬跨于开孔上。作为一种替代,WO-2009/077734公开了多个跨微孔井口阵列形成的可单独寻址(addressable)的脂质双层,每个微孔井(microwell)含有电极和与脂质双层接触的水性介质。

发明内容

[0008] 本发明的第一方面涉及方便且有效地形成包含两亲性分子的膜阵列。

[0009] 根据本发明的所述第一方面,提供了形成包含两亲性分子的膜阵列的方法,所述方法包括:

[0010] 提供包含具有限定极性介质可以通过其引入的开孔的区室阵列的支撑物的装置;

[0011] 将极性介质和非极性介质布置于所述支撑物上以在各个区室内提供包含极性介质的体积以使所述各体积的极性介质受限不会接触在邻近区室中含极性介质的体积,且包含非极性介质的层延伸穿过所述支撑物中的开孔与所述包含极性介质的体积接触;和

[0012] 将极性介质流动穿过所述支撑物中的开孔以取代非极性介质并且形成含有延伸穿过所述支撑物中的开孔与所述含极性介质的体积接触的极性介质的层和在所述含极性介质的层和所述含极性介质的体积之间的所述界面上的含两亲性分子的膜。

[0013] 这种方法提供了形成包含两亲性分子的膜阵列的方便且有效的方式。使用包含限定具有开孔的区室阵列的支撑物的装置,容许通过所述开孔将含极性介质的体积的阵列布置于所述各个区室中。因此,所述含极性介质的体积受限,不会接触在邻近区室中含极性介质的体积,由此容许极性介质的所述体积独立使用,有利于一定范围的基于阵列的应用。这种装置可以制成以容纳任何所选尺寸的体积。通常情况下,所述含极性介质的体积可以具有的平均体积范围为0.4pL~400nL。

[0014] 为了形成含两亲性分子的膜,提供的含极性介质的层延伸穿过所述支撑物中的开孔与所述含极性介质的体积接触。极性介质流动穿过所述支撑物中的开孔以取代非极性介质并且形成含延伸穿过所述支撑物中的开孔与所述含极性介质的体积接触的极性介质的层。所述含两亲性分子的膜形成于所述含极性介质的层和所述含极性介质的体积之间的所述界面上。一般而言,并正如以下进一步的描述,所述两亲性分子可以提供于包含非极性介质和/或极性介质(流动穿过所述支撑物中的开孔)的所述层中。

[0015] 这提供了形成膜的一种方便且有效的方式。通过用所述极性介质代替所述非极性介质非极性介质,所述膜很易于形成。

[0016] 现在介绍形成膜阵列的各种方法。

[0017] 有几种不同的方法可以适用于将所述含极性介质的体积布置于各个区室内。所用的具体方法部分依赖于所述支撑物的结构以及极性介质的所述单个体积是在添加至所述支撑物之前预形成还是在将极性介质添加至所述支撑物之后随后形成。所述支撑物可以在所述区室之间包含间隙或可替代地所述支撑物可以无区室之间的间隙。第一和第二类型的

可能方法现在将进行介绍。

[0018] 在将所述含极性介质的体积布置于各个区室内的第一类型的可能方法中,所述体积在布置于所述区室中之前预形成。对此一些可能的技术如下。

[0019] 在一种可能的技术中,所述极性介质和非极性介质可以通过在非极性介质中形成所述含极性介质的体积的乳液并使所述乳液从所述支撑物上流动而布置于所述支撑物上。在这种情况下,在非极性介质中含极性介质的体积通过所述开孔引入到所述区室中。这容许所述区室以直接的方式填充。极性介质的单个体积的尺寸以及所述区室的尺寸可以经过选择以为每个区室提供极性介质的单一体积。

[0020] 所述支撑物的分隔件可以包含容许非极性介质在所述区室之间流动的间隙,这正如以下更详细的描述。所述间隙经过选择以具有将极性介质的体积限定于所述区室中而所述非极性介质能够在所述间隙之间流动的尺寸。

[0021] 所述乳液可以进一步包含所述两亲性分子。这有助于在极性介质流动穿过所述支撑物中的开孔形成所述含极性介质的层时形成所述膜。所述两亲性分子的存在也稳定所述乳液。

[0022] 一般情况下,所述乳液包含比所述区室数更多的含极性介质的体积。所述过量的含极性介质的体积有助于填充适度大比例的区室。因此,为了移除所述过量的含极性介质的体积,所述支撑物可以用所述非极性介质冲洗。这种冲洗可以实施,在区室内留下含极性介质的体积,并留下用于冲洗的所述非极性介质的层,因为非极性介质的所述层延伸穿过所述支撑物中的开孔与所述含极性介质的体积接触。

[0023] 在另一可能的技术中,含极性介质的体积可以,例如,通过声学小液滴注射(acoustic droplet injection)直接分散单个区室中。采用这项技术,所述分散可以受控以分散精确数目的含极性介质的体积而无需移除过量体积。

[0024] 在预形成所述含极性介质的体积的情况下,它们可以是缓冲剂水溶液的小液滴。这种小液滴易于形成和操控。

[0025] 在预形成所述含极性介质的体积的情况下,它们可以是水凝胶的珠粒。这种珠粒也易于形成和操控并可以按需要成形。

[0026] 有利的是,所述水性凝胶可以是珠粒,其相对较硬,提供了含极性介质的体积的操纵方面的优点。填充所述区室的优点可以通过在正压下将所述珠粒的乳液或悬浮液在所述支撑物上流动而获得。使用抗压珠粒允许使用相对较高的正压力。

[0027] 在第二类型的可能方法中,所述含极性介质的相应体积可以通过将极性介质布置于所述支撑物上,而提供于各个区室中,使所述极性介质通过所述开孔进入区室中并随后例如通过将所述非极性介质流动穿过所述支撑物,或通过另一技术如喷雾提供所述含非极性介质的层。

[0028] 所述极性介质可以通过将极性介质流动穿过所述支撑物而布置于所述支撑物上。过量的极性介质可以随后被替换,在所述区室中留下离散的含极性介质的体积。在一个实例中,气体流动穿过所述基底以取代所述流动极性介质的步骤和所述流动非极性介质的步骤之间的所述过量的极性介质。在另一个实例中,所述非极性介质流动穿过所述包含非极性介质的基底层,这种流动本身会替换所述过量的极性介质。

[0029] 可替代地,所述极性介质可以通过将离散的含极性介质的体积注射到所述区室中

而布置于所述支撑物上。

[0030] 以这种方式提供极性介质的各个体积一个优点是,所述极性介质可以在不存在两亲性分子之下添加到所述支撑物上。

[0031] 所述支撑物可以在将所述各个含极性介质的体积布置于各个区室中之前采用预处理的非极性介质进行预处理。在通过将极性介质流动穿过所述支撑物而将所述极性介质布置于所述支撑物上的情况下,有利的是所述支撑物的分隔件可以包含间隙以允许非极性介质在所述区室之间流动,这正如在下面更详细的描述。在这种情况下,预处理可以对连接所述各个区室的间隙提供某种程度的密封作用,由此限制极性介质在所述间隙之间流动使得所述极性介质通过所述开孔进入所述区室中。这通过降低邻近区室中的体积发生相互接触的趋势而有助于最终形成极性介质的离散体积。这在最初没有两亲性分子存在于提供于区室阵列中的极性介质的体积中的情况下是特别有利的,因为它们如果彼此接触就可能很容易汇集。

[0032] 增加预处理,也可以用于改变所述支撑物的预处理材料和布置于区室中的极性介质体积之间的接触角。所述预处理例如可以用于提高所述支撑物对所述极性介质的拒斥性(phobicity)并提供具有更凸形状的面积以优化所述极性介质的体积和极性介质的层之间的界面上的膜形成。使用预处理改变所述支撑物的拒斥性至所需水平,容许在制作所述支撑物时考虑使用更宽数目的材料。这例如在从制造的角度而言特定的材料是合乎需要的但相对于极性和非极性介质却不具有所述合适的性质的情况下可能是有用的。所述含非极性介质的层可以进一步包含所述两亲性分子。这在极性介质流动穿过所述支撑物中的开孔以形成所述含极性介质的层时会有利于膜的形成。

[0033] 在一个实施例中,所述非极性介质在将所述非极性介质的层加入到所述支撑物之前可以包含所述两亲性分子。可替代地,在将所述层添加到所述支撑物上之后,所述两亲性分子可以加入到所述非极性介质的层中。

[0034] 在所述含非极性介质的层进一步包含所述两亲性分子的情况下,在提供含极性介质的层延伸穿过所述支撑物中的开孔与所述含极性介质的体积接触和流动穿过所述支撑物中的开孔的步骤之间,所述装置可以保持一段时间以容许所述两亲性分子迁移至所述含非极性介质的层和所述含极性介质的体积之间的界面上。

[0035] 在另一个实例中,所述流动穿过所述支撑物中的开孔的极性介质可以进一步包含所述两亲性分子。这在极性介质流动穿过所述支撑物中的开孔以形成所述含极性介质的层时同样有助于膜形成。

[0036] 在还有的另一实例中,所述非极性介质的预处理可以进一步包含两亲性分子,使得在将极性介质流动穿过所述支撑物中的开孔以形成含极性介质的层的步骤之后形成所述含两亲性分子的膜。

[0037] 所述含两亲性分子的膜可用于一定范围的应用诸如膜界面上分析物的检测,膜界面性质的测定,或分析物跨过一个或多个膜界面的通行。在一些应用中,所述膜可以用于分析包含分析物的样品,例如,生物学样品。

[0038] 在一种类型的应用中,可以使用膜蛋白,如插入到所述含两亲性分子的膜中的离子通道或孔。所述膜蛋白最初可以包含于含极性介质的体积中或所述含极性介质的层中。可替代地,所述膜蛋白可以提供于所述非极性介质中。在必要的情况下,例如,通过诸如施

加跨膜电位差能够辅助所述膜蛋白插入到所述膜中。

[0039] 某些应用可以使用跨膜电性能的测定,例如离子电流流动。为了提供这种测定,所述支撑物还可以在每一区室中包含各自电极,与所述含极性介质的体积电接触。其它类型的测量可以,例如,实施光学测量,如荧光测定和FET测定。光学测量和电测定可以同时进行(Heron AJ et al., J Am Chem Soc. 2009; 131 (5): 1652-3)。

[0040] 在所述装置在每一区室中包括各个电极的情况下,所述预处理,在使用的情况下,优选不覆盖所述电极表面,并定位于所述支撑物的其它地方。

[0041] 所述装置可以进一步包含经过布置的共用电极,在布置通过所述开孔延伸穿过所述支撑物时使所述共用电极与所述含极性介质的层电接触。

[0042] 所述装置可以进一步包括连接于所述共用电极和所述每个区室中的所述各个电极之间的电路,所述电路经过布置以获取电测量结果。这种电测定可能取决于所述含两亲性分子的膜处或通过其发生的过程。

[0043] 在形成膜阵列从而在所述支撑物上形成并且流动在非极性介质中含极性介质的体积的乳液的实施方式中,需要稳定的乳液才能防止极性介质的所述体积发生相互合并。体积的合并产生的更大体积,其可能会不能容纳于一个区室内并还产生体积尺寸范围增大。小液滴合并可以通过在形成所述乳液之前向所述非极性介质或极性介质中加入两亲性分子而阻止或最小化从而使极性介质的体积有效地涂上两亲性分子的层。然而,这在某些情况下可能会导致所述电极和所述极性介质的体积之间由于所述电极涂有两亲分子而增加电阻。在形成膜阵列从而在加入两亲性分子之前将各个极性介质的体积提供于所述各个区室中的一个替代实施方式中,所述极性介质的体积能够直接接触所述电极表面。

[0044] 所述支撑物可以具有各种有利的构造。

[0045] 所述支撑物可以包括基座和从所述基座延伸的分隔件,其限定所述区室,并限定所述含极性介质的体积,使之不会接触邻近区室中的含极性介质的体积。

[0046] 在所述支撑物的第一种可能的结构类型中,所述分隔件包括内部部分(inner portion)和外部部分(outer portion),所述内部部分限定其间无间隙的区室内部凹陷,所述含极性介质的体积布置于所述各个区室的所述内部凹陷内,所述外部部分从限定所述区室的外部部分的所述内部部分向外延伸,并且在其中形成了容许非极性介质在所述区室之间流动的间隙。有效地,所述分隔件中的间隙延伸至所述基座的半途(partway)。这种构造具有提供可靠而可控形成所述膜的优点。

[0047] 在所述装置包含提供于每个区室中的各个电极的情况下,这些电极可以提供于所述基座处。

[0048] 所述含极性介质的体积可填充所述内部凹陷。所述外部部分之间的间隙协助填充内部凹陷。因此,横穿所述内部凹陷可以形成弯月面。具体的优点实现于极性介质通过极性介质流动穿过所述支撑物而布置于各个区室中,且过量的极性介质由替代流体置换的情况下,这种替代流体可以是气体或可以是流动穿过所述基底以形成所述层的非极性介质。在这种情况下,所述外部部分之间的间隙有助于允许所述替代流体流动穿过所述基底,从而使所述非极性介质填充所述内部凹陷。

[0049] 所述外部部分之间的所述间隙通过在使所述极性介质接触所述凹陷中的所述极性介质时允许置换区室之间的非极性介质而辅助膜的形成。

[0050] 所述内部凹陷与所述分隔件的外部部分可以具有的尺寸针对含极性介质的体积进行选择以形成横穿所述内部凹陷的弯月面,且所述含极性介质的层可以形成横穿所述外部部分的弯月面。这些弯月面相对于彼此延伸至使所述含极性介质的层与所述含极性介质的体积接触的程度。因此,所述几何形状控制成膜,提供了所述形成的可靠性。这也允许控制所述含两亲性分子的膜的尺寸和稳定性。

[0051] 所述外部部分从所述开孔观察时是从所述内部凹陷的边沿向后延退。虽然不是必须的,但这有助于辅助通过极性介质填充所述内部凹陷以及在所述含极性介质的层中形成横跨所述外部部分的弯月面的上述功能。

[0052] 所述外部部分可以从所述内部部分延伸的支柱。

[0053] 所述支撑物可以如下设计以有助于形成所述含两亲性分子的膜。

[0054] 有利的是,所述分隔件的外端可以共面延伸。这提高了所述含极性介质的层对所述支撑物的黏附作用,因此提高了所述含两亲性分子的膜的形成稳定性。

[0055] 所述分隔件外端的边沿提供了所述含极性介质的层对所述支撑物的销钉作用(pinning)。有利的是为了辅助这种销钉作用,所述分隔件可以经过设计以使所述共面之内的所述分隔件外端边沿的每区室的所述总长度大于能够容纳于所述区室中最大理论球体的最大周长。

[0056] 所述内部凹陷和/或外部部分可以具有的表面具有经过布置以保留非极性介质的图案,例如,所述区室向外延伸的多个凹口(indentation),或者通常情况下的任何微加工表面特征。所述非极性介质的保留可以有利地用于改变所述基底的表面特性,例如,控制其形成的应用中的膜的形成。

[0057] 通过所述图案保留住的所提供的非极性介质可以用于改变所述极性介质体积和所述支撑物之间的接触角。这在一些实施方式中能够增加所述支撑物对所述极性介质的拒斥性并提供具有更凸外表面的极性介质体积。这随后可以在所述极性介质体积和极性介质的所述层之间的界面上形成更小的膜。所述区室的基座通常不具有微加工制作的表面特性,如此使加入到所述装置中的非极性介质的任何预处理都定位且保留于所述分隔件处。这样每个区室基座的所述各个电极之间的这种接触(如果存在),以及这种预处理(如果存在)就会最小化。

[0058] 根据本发明的第二方面,提供了用于形成含极性介质的体积的阵列的装置,所述装置包括包含分隔件的支撑物,所述分隔件包括内部部分和外部部分,所述内部部分限定其无间隙的内部凹陷,其能够限定可以容纳于邻近的内部凹陷内的含极性介质的体积不会彼此相互接触,所述外部部分从所述内部部分向外延伸,并具有允许非极性介质流动穿过所述基底的间隙。

[0059] 根据本发明第二方面的装置可以用作本发明第一方面的装置。

[0060] 在所述支撑物的第二种可能的构造类型中,所述分隔件可以具有延伸到所述基座允许非极性介质在所述区室之间流动的间隙。这有利于用所述含极性介质的体积填充所示区室,因为所述间隙容许置换先进入所述区室内的所述非极性介质。

[0061] 在所述支撑物的第三个可能的构造类型中,所述分隔件可以没有容许非极性介质在所述区室之间流动的间隙。这种类型的构造具有最大化所述区室电绝缘的优点。

[0062] 根据本发明的第三个方面,提供了用于保持含极性介质的体积的装置,包括:

[0063] 包括基座和从所述基座延伸并且限定包含非极性介质的区室阵列的分隔件的支撑物;和

[0064] 至少一些还含有在非极性介质中的含极性介质的体积的区室,所述非极性介质通过所述分隔件限制而不会与邻近区室中含极性介质的体积接触。

[0065] 根据本发明第二和第三方面的所述装置可以用作如上所讨论的生物学,医药或工业应用的宽范围内的小液滴阵列。

[0066] 根据本发明第三方面的装置可以用作本发明第一方面,或本发明的第四方面的装置,据此,提供了一种形成含极性介质的体积的阵列的方法,所述方法包括:

[0067] 提供包括基座和从所述基座延伸并且限定区室阵列的分隔件的支撑物;和

[0068] 将所述区室中的非极性介质和在所述非极性介质中含极性介质的体积布置于至少一些的区室内而使各个区室内的所述含极性介质的体积通过所述分隔件进行限定而不接触邻近区室中的含极性介质的体积。

[0069] 这种支撑物提供了一种将含极性介质的体积的阵列保持于所述非极性介质内的方便且有效的方法。所述分隔件将所述含极性介质的体积限定于各个区室内以防止与邻近区室中含极性介质的体积接触,由此容许这些体积(可以是独立体积)具有独立使用的极性介质,有助于一定范围的基于阵列的应用。这类装置可以制成以容纳任何选定尺寸的体积。一般而言,所述含极性介质的体积可能具有 $5\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 的平均直径范围,或 $0.4\text{pL}\sim 400\text{nL}$ 的平均体积范围。

[0070] 所述支撑物很容易用含所述极性介质的体积填充。在一个可能的技术中,所述含极性介质的体积可以通过在非极性介质中形成所述含极性介质的体积的乳液并使所述乳液从所述支撑物上流动而布置于所述区室中。这容许所述区室以直接的方式填充。通常情况下,所述乳液含有大于所述区室数目的含极性介质的体积。所述过量的含极性介质的体积有助于填充合理大比例的区室。因此,为了移除过量的含极性介质的体积,所述支撑物可以用所述非极性介质冲洗。这种冲洗可以实施以将含极性介质的体积保留于所述区室内。

[0071] 在另一技术中,含极性介质的体积可以,例如,通过声学小液滴注射,直接分散于各个区室中。利用这种技术,所述分散可以受控以使适当数量的所述含极性介质的体积进行分散而无需移除过量的体积。

[0072] 所述支撑物也可以使用以在所述含极性介质的体积和含极性介质的层之间形成含两亲性分子的膜。也就是说,含极性介质的层可以布置于区室的开孔上延伸穿过所述支撑物并经由所述两亲性的膜与至少一些所述含极性介质的体积接触。所述含两亲性分子的膜形成于所述含极性介质的层和含极性介质的体积之间的所述界面上。

[0073] 在一个实施方式中,所述两亲性分子可以提供于所述含极性介质的体积和/或所述非极性介质中以在提供所述含极性介质的所述层之前围绕布置于所述区室中的所述含极性介质的体积提供含两亲性分子的层。

[0074] 例如,如果所述含极性介质的体积以小液滴形式提供于所述非极性介质中,则存在于所述体积周围的两亲性分子的层会降低所述体积相互合并的趋势。因此,优选所述两亲性分子在所述非极性介质中形成所述小液滴之前添加到所述非极性介质或含所述极性介质的所述体积中。如果各个小液滴在引入到所述区室之前并不相互接触,则所述极性介质的小液滴可以在不存在两亲性分子下提供于所述非极性介质中。在后一种情况中,所述

两亲性分子可以随后加入,例如,所述含极性介质的层中,以围绕提供于所述非极性介质中的含所述极性介质的体积提供一个层的两亲性分子。

[0075] 所述含两亲性分子的膜可用于一定范围的应用,例如所述膜界面上的分析物检测,膜界面性质的检测,或跨越一层或多层膜界面的分析物通过。在一些应用中,所述膜可以用于分析包含分析物的样品,例如,生物学样品。

[0076] 在一种类型的应用中,可以使用膜蛋白,如插入到含两亲性分子的膜中的离子通道或孔。所述膜蛋白最初可以包含于所述含极性介质的体积或所述含极性介质的层中。可替代地,所述膜蛋白可以提供于所述非极性介质中。这在形成含两亲性分子的膜后将导致所述膜蛋白自发地插入。

[0077] 某些应用可以使用跨膜电性能的测量,例如离子电流。为了提供这种测定,所述支撑物还可以在每一区室中包含各自电极,与所述含极性介质的体积电接触。其它类型的测定可以,例如,实施光学测量,如荧光测定和FET测定。光学测量和电测定可以同时进行(Heron AJ et al., J Am Chem Soc. 2009; 131 (5): 1652-3)。

[0078] 区室可以包含单一极性介质的体积。可替代地,区室可以包含不只一个极性介质的体积,例如两个体积。所述含极性介质的体积可以提供于彼此顶部上。所述含两亲性分子的膜可以形成于含有极性介质的层和含极性介质的体积之间的所述界面上。膜蛋白可以提供于所述含极性介质的体积之间的界面上以在所述电极和亲水层之间提供离子或分析物传送途径。

[0079] 所述阵列的区室可以以各种形式,如以正方形包装,矩形包装或六边形包装布置进行布置。

[0080] 所述装置可以进一步包括经过布置的共用电极,从而在布置在所述开孔上延伸穿过所述支撑物时使所述共用电极与所述含极性介质的层电接触。

[0081] 所述装置可以进一步包括连接于所述共用电极和每区室中的所述各个电极之间的电路,所述电路经过布置以进行电测量。这种电测定可以取决于所述含两亲性分子的膜处或通过其发生的过程。

[0082] 所述支撑物可以具有各种有利的构造。

[0083] 在第一种可能的构造类型中,所述分隔件可以具有容许非极性介质在所述区室之间流动的间隙。这有利于采用所述含极性介质的体积填充所述区室,因为所述间隙容许置换可以先进入所述区室的所述非极性介质。

[0084] 在具有间隙的构造中,第一种可能性是所述间隙延伸至所述基座。这种构造具有非极性介质的流动可以发生于所述区室之间的优点。

[0085] 在具有间隙的构造中,第二种可能性是所述间隙延伸至所述基座的中途(partway)。例如,所述支撑物可以具有所述分隔件包括限定其间无间隙的区室内部部分的所述内部部分和从限定所述区室的内部部分的所述内部部分向外延伸并在其中形成所述间隙的外部部分。这种构造具有的优点是所述区室的电绝缘改善的同时仍允许非极性介质在所述区室之间流动。

[0086] 在第二种可能的构造类型中,所述分隔件可以不具有容许非极性介质在所述区室之间流动的间隙。这种类型的构造具有最大化所述区室的所述电绝缘的优点。

[0087] 在这种第二种可能的构造类型中,所述分隔件在横跨所述支撑物观察时具有围绕

各个区室包含一个或多个用于降低极性介质的体积和所述内分隔件表面之间的接触的凸出部分 (salient portion) 的轮廓 (profile)。这种接触表面积降低降低了所述极性介质的体积和所述内部分隔件表面之间的表面张力并且使所述体积能够在所述区室内更容易移动并例如移动至所述区室的基座以接触所述电极表面。围绕区室内部分隔件的表面提供的凸出部分的尺寸和数量可以改变。所述小液滴和所述内部分隔件表面之间接触的降低使得能够引入比在没有这种凸出部分存在下另外可能引入的小液滴更大的小液滴。

[0088] 所述分隔件可以包含一个或多个提供允许通过极性介质体积进入所述区室来替换非极性介质流出的通道的凹进部分 (re-entrant portion)。这种轮廓有利于用所述含极性介质的体积填充所述区室, 因为所述凹进部分允许替换可以预先进入所述区室的所述非极性介质。通道的尺寸可以变化。所述非极性介质更容易通过具有更大横截面面积的通道替换。所述分隔件可以包含一个或多个凸出部分和一个或多个凹进部分。所述一个或多个凹进部分的尺寸也可以确定所述极性介质的体积和所述内部分隔件表面之间的表面接触程度。

[0089] 所述支撑物可以如下设计以有助于所述含两亲性分子的膜的形成。

[0090] 有利的是, 所述分隔件的外端可以共面延伸。这改善了所述含极性介质的层对所述支撑物的附着力, 因此提高了所述含两亲性分子的膜的形成稳定性。

[0091] 所述分隔件外端的边沿提供了所述含极性介质的层对所述支撑物销钉作用。有利的是, 为了辅助这种销钉作用, 所述分隔件可以经过设计以使所述共面内所述分隔件外端边沿的每区室的所述总长度大于所述区室中能够容纳的最大理论球体的最大周长。

[0092] 所述区室的开孔的尺寸可以经过选择以使当所述含极性介质的层通过所述开孔延伸穿过所述支撑物提供时, 所述含极性介质的层形成弯月面延伸进入所述区室至使所述含极性介质的层接触至少一些所述含极性介质的体积的程度。这容许对所述含两亲性分子的膜的尺寸和稳定性进行控制。在所述间隙向下延伸至限定内部和外部部分的基座中途的构造中, 所述外部部分的布置和尺寸将决定所述弯月面是否销钉于所述外部部分或所述内部部分处。

[0093] 关于极性和非极性介质的以下评论适用于本发明的所有方面。

[0094] 所述极性介质可以是亲水性介质。所述非极性介质可以是疏水性介质。在具体实施方式中, 单一极性介质的体积提供于区室中。

[0095] 所述含极性介质的体积通常是含有水性介质的体积, 例如, 缓冲剂水溶液。

[0096] 提供于所述区室中的各个体积的极性介质可以是相同的或不同的。这些体积每一个可以包含不同的物质或不同浓度的同一种物质。例如, 所述含极性介质的体积可以含有各种用量的物质A而所述极性层可以包含物质B, 其中A和B之间可以发生可检测的相互作用或反应。按照这种方式, 物质B可以穿过所述离子通道进入所述含所述极性介质的各个体积中。通过检测所述各个相互作用或反应, 例如, 荧光信号, 大量离子通道的实验可以同时进行, 例如, 以确定B和A之间的最佳反应或相互作用。

[0097] 所述含极性介质的层通常可以包含水性介质, 例如, 缓冲剂水溶液。

[0098] 所述层的极性介质可以是与提供于所述区室中的所述各个体积相同或不同的极性介质。它们可以包含不同的物质或不同浓度的相同物质。

附图说明

- [0099] 本发明的实施方式现在将通过非限制性实施例参照附图进行描述,其中:
- [0100] 图1是保持极性介质体积阵列的装置的平面视图图像;
- [0101] 图2是图1所述装置的所述支撑物的部分平面视图;
- [0102] 图3是沿着图2中线III-III选取的所述支撑物的单个区室的横截面侧视图;
- [0103] 图4是限定区室的所述分隔件的支柱的替代图案的等角投影图(isometric projection);
- [0104] 图5是图4的图案中所述支柱的平面视图。
- [0105] 图6和图7是所述支柱另一替代图案的等角投影图;
- [0106] 图8和图9是所述支柱另一替代图案的平面视图;
- [0107] 图10是所述限定区室的分隔件支柱的替代图案的等角投影图;
- [0108] 图11是图10的图案中的所述支柱的平面视图;
- [0109] 图12是所述分隔件的第一替代构造的等角投影图;
- [0110] 图13是图12的所述分隔件的平面视图。
- [0111] 图14是所述分隔件具有第二替代构造的所述装置的支撑物的单个区室的横截面侧视图;
- [0112] 图15是所述分隔件的第二替代构造的等角投影图;
- [0113] 图16是图15的所述分隔件的平面视图;
- [0114] 图17是所述分隔件的修改构造的等角投影图;
- [0115] 图18是图17的所述分隔件的平面视图;
- [0116] 图19是所述分隔件的修改构造的等角投影图;
- [0117] 图20是图19的所述分隔件的平面视图;
- [0118] 图21是所述分隔件的修改构造的等角投影图;
- [0119] 图22是图21的所述分隔件的平面视图;
- [0120] 图23是所述分隔件的修改构造的等角投影图;
- [0121] 图24是图23的所述分隔件的平面视图;
- [0122] 图25是所述分隔件的修改构造的等角投影图;
- [0123] 图26是图25的所述分隔件的平面视图;
- [0124] 图27是引入一个阵列的流动池组件的图形;
- [0125] 图28是通过微流体流连接制成的水溶液小液滴的图像;
- [0126] 图29是含有突出区室外的珠粒的装置的示意性横截面视图;
- [0127] 图30是含有多个亲水性介质的体积的装置的示意性横截面视图;
- [0128] 图31是提供了极性介质的层的所述装置的部分的横截面视图;
- [0129] 图32a至图32i是在一种方法的连续步骤中的区室的一组示意性侧视图;
- [0130] 图33a至图33h是在一种方法的连续步骤中的区室的一组示意性侧视图;
- [0131] 图34a至图34b是具有施加的预处理非极性介质的区室的示意性侧视图;
- [0132] 图35是在计算机模拟开始点的区室侧视图;
- [0133] 图36a和图36b是计算机模拟期间的区室侧视图;
- [0134] 图36c是内部凹陷填充了极性介质的体积的区室的共焦图像;

- [0135] 图37是计算机模拟期间不同尺寸的区室的侧视图；
- [0136] 图38a至图38b是内部凹陷填充了极性介质的体积的图21的构造中的支撑物的一组图像；
- [0137] 图39a至图39b是内部凹陷填充了极性介质的体积的图19的构造中的支撑物图像；
- [0138] 图40a和图40b是在膜阵列形成之后图19的构造中的支撑物图像；和
- [0139] 图40c是具有形成的膜的区室的示意性侧视图。
- [0140] 图41是显示测定通过MspA纳米孔的离子电流获得的电数据的电流相对于时间的曲线图；
- [0141] 图42是所述装置的电路图；
- [0142] 图43是对于极性介质的各个体积的寿命相对于尺寸的曲线图；
- [0143] 图44a至图44c是区室中不同尺寸的小液滴的示意性侧视图；
- [0144] 图45和图46是图15和图16中所示类型装置的示意性横截面视图；
- [0145] 图47是横跨区室的所述开孔形成的半月面的侧视图；
- [0146] 图48a至图48b显示了示出螺旋酶控制的DNA移动通过在所施加180mV电压下插入三嵌段共聚物的MspA- (B2C) 纳米孔的作为以ms计的的时间的函数的电流迹线 (current trace), 其中图48a和图48b显示了两个螺旋酶控制的DNA易位通过MspA纳米孔的实例。
- [0147] 图49显示了对应于凝血酶存在 (钳位 (block) 标记2) 和不存在 (钳位标记1) 的特性钳位信号电平 (block level) 的电流迹线；
- [0148] 图50显示了一个已暴露于MspA- (B2C) (SEQ ID NO:1) 纳米孔的芯片的明场图像；和
- [0149] 图51显示了一个还未暴露于MspA- (B2C) (SEQ ID NO:1) 纳米孔的芯片的明场图像。
- [0150] 本说明书参考以下的各种序列。
- [0151] SEQ ID NO:1显示了MspA- (B2C) 的氨基酸序列。MspA- (B2C) 的所述氨基酸序列是SEQ ID NO:2具有以下突变G75S/G77S/L88N/Q126R的变体。
- [0152] SEQ ID NO:2显示了所述MspA单体的MS-B 1突变体的成熟形式的氨基酸序列。这种突变体缺失所述信号序列以及包括以下突变:D90N,D91N,D93N,D118R,D134R和E139K。
- [0153] SEQ ID NO:3显示了实施例5中所用的所述多核苷酸序列之一。它在其3'端经由四个间隔子单元连接至SEQ ID NO:4的所述5'端。
- [0154] SEQ ID NO:4显示了实施例5中所用的所述多核苷酸序列之一。它在其5'端经由四个间隔子单元连接至SEQ ID NO:3的所述3'端。
- [0155] SEQ ID NO:5显示了编码 α -溶血素-E111N/K147N(α -HL-NN; (Stoddart, D.S., et al., (2009), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, p7702-7707))的一个亚基的多核苷酸序列。
- [0156] SEQ ID NO:6显示了 α -HL-NN一个亚基的所述氨基酸序列。
- [0157] SEQ ID NO:7 (以下所示) 是一个适体的多核苷酸序列, 其中X是无碱基位点XXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG。这个序列并不符合WIPO ST.25因此未包含于所述序列列表内。
- [0158] SEQ ID NO:8显示了DNA链的所述多核苷酸序列。这条链具有连接至所述序列中位

置1处的所述胸腺嘧啶的BHQ1标记和连接至所述序列中位置15处的所述胸腺嘧啶的FAM标记。

[0159] SEQ ID NO:9显示了编码所述MspA- (B2C) 突变体MspA单体的所述多核苷酸序列。MspA- (B2C) 的所述氨基酸序列是SEQ ID NO:2具有以下突变G75S/G77S/L88N/Q126R的变体。

[0160] SEQ ID NO:10显示了编码所述MspA单体的所述MS-B 1突变体的所述多核苷酸序列。这个突变体包括以下突变:D90N,D91N,D93N,D118R,D134R和E139K。

具体实施方式

[0161] 图1显示了保持非极性介质中的极性介质体积2的阵列的装置1。所述装置1包括提供区室4的阵列的支撑物3。在使用中,所有所述区室4包含非极性介质。至少一些所述区室4(在本实施例是大部分所述区室4)包含在所述非极性介质中的极性介质的单个体积2。

[0162] 所述支撑物3的构造如图2和图3中更详细所示。所述支撑物3包括基座5和从所述基座5延伸的分隔件6。所述分隔件6包含多个从基座5延伸出的支柱7,如图3中所示,在本实施例中是垂直地延伸的。所述区室4具有提供于所述支柱7远端处的开孔。这些开孔提供了从所述区室4进入相邻所述支撑物3的空间的连通,而极性介质的体积可以通过所述开孔引入到所述区室4中。

[0163] 所述支柱7可以具有如图2所示的不同形状,而使它们将所述区室4限定于规则的正方形阵列中。所述支柱7经过成形而使它们将限制所述区室4中极性介质的体积2不会接触邻近区室中包含极性介质的体积2。在本实施例中,所述支柱7在区室4的角落中包含十字形支柱7a,其中臂部突入所述区室4中,而其它支柱7b沿着所述区室4的每一侧,在所述十字形支柱7a和所述其它支柱7b之间具有间隙8。所述区室4经过布置而使所述极性介质的体积2在物理上彼此分离。这就防止了极性介质的所述体积2不会相互合并或接触而形成界面。这就提供了极性介质体积2的非常稳定的阵列,其能够存储一段相当长的时间。本文中所述术语“内”和“外”描述了所述区室4中从外端的所述开孔朝向内端的所述基座5的相对位置。

[0164] 所述支柱7在其之间具有间隙8。在这个实施例中,所述间隙8延伸了从所述开孔至所述基座5的整个距离。所述间隙8有足够的尺寸以允许非极性介质在所述区室4之间流动,而同时保持在所述区室4中极性介质的体积2的分离。提供所述间隙8容许所述非极性介质在所述区室4之间流动。这大大有助于区室4的填充,因为非极性介质可以被通过开孔进入区室4的极性介质体积2替换。所述间隙8也允许对所述支撑物3中的非极性介质的水平进行控制并且横跨所述阵列进行平衡。所述支柱7之间的所述间隙8如此而使极性介质的体积2受限而不会移动通过所述区室4之间的所述间隙8或不会与邻近区室中包含极性介质的体积2接触。

[0165] 可选地,阻挡件(bam) 10可以围绕所述支撑物3的周边提供,其有助于用非极性介质填充所述支撑物3的外周边沿。一个或多个通道11可以提供于所述阻挡件10上,非极性介质可以通过其引入所述支撑物3或从所述支撑物3排出。

[0166] 所述支撑物3可以由许多具有高电阻的不同材料(包括但不限于未掺杂的晶体硅(即,硅晶片),SU8,聚碳酸酯和/或聚酯,并包括这些或其它材料的任何组合)制成。所述支撑物3可以采用对于这种材料的传统技术(包括但不限于,沉积和去除技术例如蚀刻或激光

加工) 进行制作。

[0167] 正如图3中所示,所述基座5包括基底12。所述基底12支撑每个区室4中的电极13。在本实施例中,所述电极13显示为凹入所述基底12中,但它们能够在所述基底12的暴露表面上可替代地沉积成外层。提供所述电极13以与所述区室4中包含的极性介质的体积2电接触,并在下面更详细地讨论。

[0168] 所述基底12可以包含可选的表面涂层14。所述表面涂层14可以提供高电阻的外层。所述基座5的一种可能的材料组合是所述基座由未掺杂的结晶硅(即,硅晶片)制成,而所述涂层14由SU8制成。在图2中所示的实施例中,所述表面涂层14提供于所述基底12的顶部,而因此具有与所述电极13对齐以允许所述电极13和所述极性介质的体积2之间电接触的孔道(aperture) 15。作为一种替代方案,所述电极12能够图案化于所述表面涂层14相同层中或在表面涂层14的顶部上。

[0169] 所述分隔件6可以由与所述支撑物3的基座12相同或不同的材料制成,并可以具有相同或不同的表面特性。所述分隔件6通常是非极性的,并可以例如由Permex制成。所述分隔件6可以可选地包含表面涂层(未示出)以改性其电和/或物理性质。

[0170] 图2中所示的所述支柱7的具体形状和布置是不重要的而所述支柱7可以具有各种不同的形状以限定所述区室4,从而限制所述区室4中的极性介质的体积2不会与邻近区室中的含极性介质的体积2接触。通过举例的方式,图4~图8显示了如下所述支柱7的可替代形状和布置的一些实例。

[0171] 图4和图5显示了支撑物3,其中所述分隔件6包含包括与图2相似布置的十字形支柱7a和其它支柱7b的支柱7。因此,所述支柱7与短的和长的间距(pitch)组合以防止极性介质的体积2合并,并且改善了支柱稳定性。

[0172] 图6~图9显示了其它支撑物3,其中所述支柱7已修改了形状和图案。在每一种情况下,支柱7具有的间隙8延伸了自所述开孔至所述基座5的整个距离。所述支柱7布置的模式中将区室4限定于所述支撑物3的区域内,其中所述支柱7很宽地相互间隔开。所述支柱7之间的间隙8如此而使所述极性介质的体积2受限而不能在所述区室4之间移动或不会与邻近区室中的含极性介质的体积2接触。在图6中,所述分隔件6包括圆形支柱7d的阵列。

[0173] 在图7中所述分隔件6包括了三星支柱7g的阵列。所述三星支柱7g具有三个有弧形凹边(re-entrant side)和扩大端(enlarged end)的臂部。所述三星支柱7g限定了多个区室4,其中三个三星支柱7g围绕每个区室等距间隔。在图8和图9中,所述分隔件6包括十字形支柱7h和T形支柱7i的阵列,分别限定多个区室4。所述十字形支柱7g和T形支柱7h具有凹边。

[0174] 在图7~图9的这些实施例中,所需用于提供区室4的支柱7的数目,例如,小于图2或图6的布置。提供数目减少的所述支柱7会使得所述阵列更容易制作,并提高所述各个支柱的机械弹性。

[0175] 还发现,与例如,图4或图7~图9的更具结构弹性的支柱,特别是100 μm 等级高度的支柱7和25 μm 等级宽度的支柱相比较,图6所示的所述圆形支柱机械弹性较小,更易于塌陷,或扭曲。具有较高宽:高比的支柱7因而是优选的。

[0176] 图11和图12显示的支撑物3,其中所述分隔件6包含包括除了所述十字形支柱7a和其它支柱7b的表面62用图案如下进行微图案化的修改之外具有与图4相同的总体布置的十

字形支柱7a和其它支柱7b的支柱7。具体而言,这些表面62凹进,具有多个凹口(indentation)63,所述凹口向区室4外延伸(沿着所述十字形支柱7a和其它支柱7b的整个长度)。在这个实施例中,所述凹口63横截面呈矩形。

[0177] 在所属凹口63之间的所述表面62处于围绕所述区室4延伸的公共曲面(curved plane)内。这些表面62物理上将极性介质的体积2限定于所述区室4内。因此,所述表面62的尺寸控制可以容纳于所述区室4中的所述极性介质的体积2的尺寸。

[0178] 凹口63保持非极性介质,这降低接触极性介质的体积2的所述分隔件6的表面积。这改变了所述支柱7的表面特性,排斥极性介质,因此协助将极性介质的体积2保持于所述区室4中,并协助允许所述极性介质进入所述区室中。在一般情况下,所述图案能够包括实现这种效应的其它表面特征。

[0179] 所述凹口63和表面62具有的宽度相比于保持于所述区室4中的极性介质的体积2的体积尺寸较小。所述凹口63和表面62具有的宽度优选至多20 μm ,更优选至多10 μm 。例如,如果区室4的尺寸参照能够容纳于所述区室4中的最大理论球体的直径d进行表征,则所述凹口63和表面62的宽度至多0.1d,优选至多0.05d。在所述直径d为140 μm 的典型实施例中,所述凹口63和表面62的宽度为5 μm 。所述凹口63的深度经过选择以允许所述通道保留所述非极性介质。在图11和图12的实施例中,所述通道具有的深度为5 μm ,提供了1:1的纵横比。然而,较深的凹口63会提供非极性介质更有效的保留。

[0180] 在附图中所示的所有构造中,所述支柱7具有相同的高度以使所述支柱7的外端9共面延伸,如图3中所示,从而为所述支撑物3提供刷状平面的上表面。当提供具有相同高度的支柱是优选的构造时,可以提供具有不同高度的支柱的构造。

[0181] 现在将描述一些对于所述分隔件6的替代构造,其中所述分隔件6不具有支柱7和延伸整个距离到所述基座5的间隙8。在一般情况下,例如,如果所述非极性介质充分水合以提供电极13之间的电传导路径时,所述分隔件中任何间隙的深度降低能够增加区室4之间的电绝缘并降低不同区室4的所述电极13之间补偿电流的趋势。除了所述分隔件6的替代构造之外,支撑物2另外具有如上所述的相同构造。

[0182] 所述分隔件的第一替代构造如图12和图13中所示并如下进行布置。在所述第一替代构造中,所述分隔件6不具有容许非极性介质在所述区室4之间流动的间隙。具体而言,所述分隔件6具有凹部30,其限定所述区室4而在那些区室4之间没有间隙。所述分隔件6可以由从所述基座5延伸的共同本体(common body)31制成。在这种情况下,所述基座5具有形成所述区室4的内端的平面表面。所述共同本体31可以形成为与所述基座5层压的单独层,但可替代地可以与所述基座5和通过去除材料形成的所述凹部30整合至一起。

[0183] 在本实施例中,所述分隔件6按照横跨所述支撑物3观察具有与第二替代构造中所述分隔件的内部部分20的轮廓相同的轮廓。即,所述轮廓是起伏的,并包括围绕各个区室4的多个突出到所述区室4中的凸出部分32和多个其中所述区室4伸入所述分隔件6中的凹进部分33。

[0184] 所述凸出部分32物理上经过布置以将极性介质的体积2限定于所述区室4内。因此,所述凸出部分32的尺寸控制可以容纳于所述区室4中的所述极性介质的体积2的尺寸。

[0185] 所述凹进部分33提供了延伸出容纳于所述区室4内的极性介质的体积2之外的通道。因此,所述凹进部分33允许通过极性介质的体积2进入所述区室4中而置换出的非极性

介质流出。

[0186] 这种起伏结构也降低与极性介质的体积2接触的分隔件6的表面积。这有助于容许极性介质的体积2移动到所述区室4的基座由此协助与所述电极13电接触。

[0187] 原则上,任何数量的凹进部分33在原理上都能够提供,诸如3,4,5,6等。然而,人们会需要用对于极性介质的所述体积2的所述接触表面平衡所述凸出部分32的数目。

[0188] 如图12中所示的所述凸出部分32具有圆边。可替代地,所述凸出部分32可以具有锐边。这种锐边可能会进一步降低所述区室4的边缘和极性介质的体积2之间的接触程度。相反,锐边可能会刺穿两亲分子的层。有利的是降低极性介质的所述体积2与所述区室4内表面的接触程度。具有凸出部分32使所述极性介质的更大体积2能够用于区室4的给定体积。

[0189] 正如能够从图12可见,所述凹进部分33的尺寸和形状决定了能够与极性介质的体积2接触的表面积。所述凸出部分32和凹进部分33是相互关联的,因为通常情况下所述凹进部分33的横截面宽度越大,所述区室4的壁的表面积降低越多。

[0190] 因此,相比于上述的构造,在第一替代构造中,所述分隔件6提供了限定极性介质的所述体积2并防止它们接触或合并的相同功能,但所述区室4之间的电绝缘(electrical isolation)会由于所述分隔件6中不存在间隙而增加。所述分隔件6中不存在间隙也会降低允许非极性介质在区室4之间流动的有益效果,但这在通过所述凹进部分33填充区室4提供容许置换出的非极性介质流出(辅助极性介质的体积2插入)的通道时会在一定程度上得以缓解。这允许插入最大尺寸的极性介质的体积2,其移动会受限于所述凸出部分32。

[0191] 所述分隔件6具有相同的高度以使所述分隔件6的外端34共面延伸,如图12中所示,从而为所述支撑物3提供刷状平坦的上表面。

[0192] 现在将描述对于所述分隔件6的一些替代构造,其中所述分隔件6包括限定其间无间隙的区室内部凹陷的内部部分,和从所述内部部分向外延伸的外部部分,所述内部部分限定具有容许非极性介质在所述区室之间流动的间隙的所述区室外部部分。因此,所述间隙有效延伸至所述基座5的中途。除了所述分隔件6的替代构造之外,以下支撑物2另外具有如上所述的相同构造。

[0193] 对于所述分隔件的第二替代构造如图14,图15和图16所示并如下进行布置。

[0194] 用于保持非极性介质中的极性介质体积2的阵列的所述装置1包括提供区室4的阵列的支撑物3。在使用中,所有的所述区室4包含非极性介质,至少一些所述区室4包含非极性介质中的极性介质的单一体积2。

[0195] 所述支撑物3包括基座5和从所述基座5延伸的分隔件6。本文中所述术语“内”和“外”描述了从所述外端处的所述开孔朝向所述内端处的所述基座5在所述区室4中的相对位置。

[0196] 正如下更详细的描述,所述分隔件6限定具有开孔提供于所述分隔件6远端的区室4。这些开孔提供了从所述区室4进入毗邻所述支撑物3的所述空间的连通,极性介质的体积可以通过所述开孔引入到所述区室4中。所述区室4经过布置以使极性介质的体积2在物理上相互分离。这就防止了极性介质的体积2发生相互合并或相互接触以形成界面。这提供了能够存储一段相当长的时间的非常稳定的极性介质体积2的阵列。

[0197] 可选地,阻挡件(采取图1中所示的形式)可以围绕所述支撑物3的外周提供,这有

助于用非极性介质填充所述支撑物3的外周边沿。一个或多个通道可以提供于所述阻挡件上,通过这些通道非极性介质可以引入所述支撑物3中或从所述支撑物3排出。

[0198] 所述支撑物3可以由各种具有高电阻的不同材料制成,包括但不限于未掺杂的晶体硅(即,硅晶片),SU8,聚碳酸酯,和/或聚酯,并包括这些或其它材料的任何组合。所述支撑物3可以使用这些材料的传统技术,包括,但不限于,沉积和去除技术例如蚀刻或激光加工进行制作。

[0199] 所述基座5包括基底12。所述基底12支撑每个区室4中的电极13。在本实施例中,所述电极13如所示凹进到基底12中,但它们可以可替代地在所述基底12的暴露表面上沉积为外层。提供所述电极13以与所述区室4中包含的极性介质的所述体积2电接触,并将在下面更详细地讨论。

[0200] 所述基底12可选地包括一个表面涂层。所述表面涂层可以提供高电阻外层。对于所述基座5的一个可能的材料组合是所述基座5由未掺杂的结晶硅(即,硅晶片)制成而所述涂层由SU8制成。这种表面涂层可以提供于具有与所述电极13对准的孔(aperture)的所述基底12的顶部以允许所述电极13和极性介质的体积2之间电接触。作为一种替代方案,所述电极12能够在所述表面涂层的相同层内或在所述表面涂层的顶部进行图案化。

[0201] 所述分隔件6可以由与支撑物3的所述基座12相同或不同的材料制成,并可以具有相同或不同的表面特性。所述分隔件6通常是非极性的,并可以例如由Permex制成。所述分隔件6可以可选地包括表面涂层(未示出)以改变其电学和/或物理性质。

[0202] 图15和图16显示了所述分隔件6的一个具体布置,但这并不重要并且所述分隔件6可以具有多种不同的布置以限定所述区室4,以限制所述区室4中的所述极性介质的体积2不与邻近区室中含极性介质的体积2接触。

[0203] 在图15和图16的布置中,所述分隔件6包含内部部分20和外部部分21。

[0204] 所述分隔件6的内部部分20限定的内部凹陷22构成了所述区室4的所述内部部分,而所述区室4的那些内部部分之间没有间隙。所述分隔件6的内部部分20可以由从所述基座5延伸的共同本体构成。在这种情况下,所述基座5具有的平面表面构成了所述区室4的所述内端。所述内部部分20可以形成为与所述基座5层压的单独层,在去除材料形成孔(aperture)之后变成所述内部凹陷5。可替代地,所述内部部分20可以与所述基座5和通过除去所述整体构件的材料而形成的所述凹槽22一起构成整体。

[0205] 在这个实施例中,所述分隔件6的所述内部部分20具有的轮廓按照横跨所述支撑物3进行观察时是围绕各个区室4呈圆形。

[0206] 所述分隔件6的所述外部部分21从所述内部部分20向外延伸并限定所述区室4的所述外部部分。在本实施例中,所述分隔件6的所述外部部分21包括按照图4和图5中所示的所述分隔件6的构造中所述支柱7的类似模式在本实施例中垂直地从所述分隔件6的所述内部部分20(如图15所示)延伸出的多个支柱23。具体而言,所述区室4的角落中的十字形支柱部23a具有的臂部朝向所述区室4伸出,多个其它支柱23b沿着所述区室4的每一侧面伸出,所述十字形支柱23a和所述其它支柱23b之间,以及所述其它支柱23b之间具有间隙24。

[0207] 所述支柱23在其间具有间隙24。在本实施例中,所述间隙24延伸到所述分隔件的所述内部部分20中并因此仅至所述基座5的中途。所述间隙24具有足够的尺寸以允许非极性介质在所述区室4之间流动,同时使所述区室4中的极性介质的体积2保持分离。提供间隙

24允许所述非极性介质在所述区室4之间流动。这有助于填充区室4,因为非极性介质可以被进入区室4中的极性介质的体积2置换。以下将给出这种情况的进一步描述。所述间隙24还允许控制所述支撑物3中非极性介质的水平,以及横跨所述阵列进行平衡。因此,相比于以上描述的构造,在第二个替代构造中,所述分隔件4提供了限定极性介质的体积2和防止它们接触或合并的相同功能,所述间隙24提供了容许非极性介质在区室4之间流动的所述间隙8的相同功能。

[0208] 然而,区室4之间的所述电绝缘由于所述内部部分20中不存在间隙而增加。

[0209] 所述支柱23从那些内部凹陷22的所述开孔观察时是从所述内部凹陷的22边沿向后延退(set back)。这就在任何给定的支柱23和所述毗邻的内部凹陷22之间的所述分隔件6的所述内部部分20的所述上表面上产生了一个台阶(step)。

[0210] 所述支柱23具有相同的高度以使所述支柱24的所述外端25共面延伸,如图15中所示,从而为所述支撑物3提供刷状平面的上表面。

[0211] 所述分隔件6的内部部分20和外部部分21的相对高度可以变化。在一个典型的实施方式中,所述内部部分20具有90 μm 的高度和170 μm 的直径,而外部部分21具有60 μm 的高度。

[0212] 在这个实施例中,所述分隔件的所述内部部分进一步包括两个凹进部分28。从图15和图16中可以看出,相比于区室4的所述内表面,所述凹进部分的尺寸相对较小。

[0213] 所述分隔件的修改构造如图17和图18中所示。这除了以下修改之外类似于图15和图16的构造。

[0214] 首先,由所述分隔件6的所述内部部分20构成的所述内部凹陷22从横跨所述支撑物3的所述区室4的开孔观察时具有不呈圆形的轮廓。具体而言,所述轮廓是起伏的,并包括围绕各个区室4的多个突出到所述区室4中的凸出部分26和多个其中所述区室4伸入所述分隔件6中的凹进部分27。

[0215] 所述凸出部分26经过物理布置以将极性介质的体积2限定于所述区室4中。因此,所述凸出部分26的尺寸控制了可以容纳于所述区室4中的极性介质的体积2的尺寸。

[0216] 所述凹进部分27提供延伸出容纳于所述区室4中的极性介质的体积2之外的通道。因此所述分隔件6的所述内部部分20有效地具有的表面发生凹进,具有多个向外延伸出所述内部凹陷22的通道。因此,所述凹进部分27允许通过极性介质的体积2进入所述区室4中置换的非极性介质流出。

[0217] 这种起伏的构造还降低了与极性介质的体积2接触的所述分隔件6的表面积。这用于允许极性介质的体积2移动到所述区室4的基座并由此辅助与所述电极13电接触。

[0218] 原则上,任何数目的凹进部分27在原理上能够提供,如3,4,5,6等。然而,人们需要用对于极性介质的体积2的所述接触表面平衡凸出部分26的数目。

[0219] 其次,所述分隔件6的所述外部部分21的所述支柱23具有不同的图案。具体而言,所述区室4的角落中的十字形支柱23c具有的臂部在沿着所述区室4的所述侧面的方向上延伸,一对其它支柱23c沿着所述区室4的每个侧面延伸,在所述十字形支柱23c和所述其它支柱23d之间,以及所述其它支柱23d之间具有间隙24。这使所述支柱23能够固定于所述内部部分20上,但所述支柱23具有相同的功能和效果。

[0220] 如图17中所示的所述凸出部分26具有圆边。可替代地,所述凸出部分26可以具有

锐边。降低极性介质的体积2与所述区室4的所述内表面接触的程度是有利的。具有凸出部分26对于给定体积的区室4能够使用更大的所述极性介质的体积2。

[0221] 正如从图17中所见,所述凹进部分27尺寸和形状决定了能够接触极性介质的体积2的表面积。所述凸出部分26和凹进部分27相互关联,因为通常情况下所述凹进部分27的横截面宽度越大,所述区室4的壁的表面积就降低越多。

[0222] 对于所述分隔件6的修改构造如图19和图20中所示。这除了所述内部凹陷22的表面64和所述支柱23的表面66具有以下进一步描述的图案的改变之外是类似于图15的构造。

[0223] 对于所述分隔件6还有的进一步改进的构造如图21和图22中所示。这除了所述图案的尺寸之外与图19的构造是相同的。

[0224] 对于所述分隔件6还有的进一步改进的构造如图23和图24中所示。这除了所述内部凹陷22的表面64(但所述支柱23的表面66则没有)具有以下描述的图案的改变之外是与图15的构造相同的。

[0225] 对于所述分隔件6还有的进一步改进的构造如图25和图26中所示。

[0226] 图19~图26中所示的所述区室4的不同表面上的所述图案现在将进行更详细的描述。

[0227] 具体而言,所述内部凹陷22的所述表面64沿着内部凹陷22的整个长度凹进,具有多个凹口65向外延伸出所述内部凹陷22,因此向外延伸出所述区室4。在这个实施例中,所述凹口65横截面呈矩形。类似地,所述支柱23的表面66凹进,具有多个向外延伸出所述区室4的凹口67(除了在图15的构造外)。在这个实施例中,所述凹口67横截面呈矩形。

[0228] 所述凹口65之间的每一内部凹陷22的表面64处于围绕所述内部凹陷22延伸的公共弯曲面中。这些表面64在物理上将极性介质的体积2限定于所述内部凹陷22内。因此,所述表面64的尺寸控制了可以容纳于所述内部凹陷22内的极性介质的体积2的尺寸。

[0229] 所述凹口65保持极性介质,这降低了与极性介质的体积2接触的所述分隔件6的表面积。这会改变所述支柱7的表面特性,排斥极性介质因此有助于限定保持于所述内部凹陷22中的极性介质的体积2,并有助于允许所述极性介质进入所述内部凹陷22中。在一般情况下,所述图案能够包括其它实现这种效应的表面特征。

[0230] 如下所述进行非极性介质70的初始预处理。所述凹口65和67通过在所述基底3上的将其芯吸(wicking)而有助于传播非极性介质70的预处理。

[0231] 添加至所述分隔件6的非极性介质70的预处理通过用于增加所述分隔件6对所述极性介质的拒斥性并且因此增大极性介质体积2和所述分隔件6之间的接触角的表面张力/毛细作用而保持于所述凹口65中。这有助于限定的极性介质的体积2中的弯月面的形状。具有高毛细作用的凹口65是优选的,因为它们更有效地保留所述非极性介质并防止或阻止非极性介质流动到所述电极12的表面上。因此,随后加入到所述区室的极性介质能够直接接触所述电极13。

[0232] 所述凹口65和表面64根据一个实施方式具有优选至多 $20\mu\text{m}$,更优选至多 $10\mu\text{m}$ 的宽度。所述凹口65和表面64具有的宽度相比于保持于所述内部凹陷22中的极性介质的体积2的体积的大小是比较小的。例如,如果所述内部凹陷22的尺寸参照能够容纳于所述内部凹陷22中的最大理论球体的直径d进行表征,则所述凹口65和表面64具有的宽度优选至多 $0.1d$,更优选至多 $0.05d$ 。通过举例的方式,在所述内部凹陷22具有 $90\mu\text{m}$ 的深度的情况下,所

述外部部分23具有30 μm 的高度和140 μm 的直径d,所述凹口65和表面64可以具有的宽度为5 μm 。同样,在图19的构造中,所述凹口65和表面64具有的宽度为5 μm 。

[0233] 所述凹口65的深度经过选择以允许所述通道保留所述极性介质。以举例的方式,在图19的构造中,所述凹口65具有5 μm 的深度,提供了1:1的纵横比。

[0234] 然而,更深的凹口65会提供对极性介质更有效的捕获和保留。以举例的方式,在图25和图21的构造中,所述凹口65具有50 μm 的深度,提供了10:1的纵横比。这由于更高的毛细作用而更有效地将油捕获和保留于所述通道内。所述可用的小液滴直径d为100 μm 。更高纵横比孔井的另一个好处是,它们提供了更小的小液滴直径,这进而提供了更小的两亲性膜面积。

[0235] 所述凹口67之间的所述支柱23的所述表面66处于围绕所述内部凹陷22延伸的共同曲面内。所述凹口67保持极性介质,其排斥非极性介质。添加至所述分隔件6的非极性介质70的预处理通过用于增加所述分隔件6对所述极性介质的拒斥性由此有助于填充所述内部凹陷22的表面张力/毛细作用而保持于所述凹口65中。

[0236] 所述凹口67和表面66具有的宽度优选至多20 μm ,更优选至多10 μm 。所述凹口67和表面66具有的宽度相比于保持于所述内部凹陷22中的极性介质的体积2的体积大小是较小的。例如,如果所述内部凹陷22的尺寸参照能够容纳于所述内部凹陷22中的最大理论球体的所述直径d进行表征,则所述凹口65和表面64具有的宽度优选至多0.1d,更优选至多0.05d。以举例的方式,其中所述内部凹陷22具有90 μm 的深度,所述外部部分23具有30 μm 的高度和140 μm 的直径d,所述凹口65和表面64可以具有的宽度为5 μm 。然而,更深的凹口67会提供对极性介质更有效的保留作用,但由于所述有限的空间难以提供更高纵横比的凹口67。

[0237] 以下评述适用于具有任何上述构造的支撑物3。

[0238] 所述支撑物3可以包括任何数目的区室4。所述支撑物3可以包括,例如,2~10⁶范围内的区室4数目,但通常可以处于100~100000的范围内。

[0239] 各个区室4具有通过所述分隔件6之间的间隔限定的理论横截面积和由所述分隔件6的高度限定的理论体积。所述理论体积通常对于所述阵列的所有区室4是相同的。

[0240] 正如以上的这些实施例中,所述区室4横跨所述支撑物3观察时可以具有不规则形状的外周。无论所述区室4的形状如何,在区室包含极性介质的单一体积的情况下,区室4的尺寸可以参照所述区室4中能够容纳的最大理论球体进行表征。在极性介质的体积2是球形(那是不重要的)的情况下,那大约就是能够容纳的极性介质的最大体积2的尺寸。事实上,在极性介质的体积是液体的情况下,它们能够依赖于所述区室的尺寸和所述支撑物的表面性质而变形。这种尺寸通常可以为50 μm ~500 μm ,更典型地为70 μm ~200 μm 。

[0241] 所述阵列将通常含有基本上相同尺寸的极性介质的体积2。所述区室4的尺寸可以根据要包含的极性介质的体积2的尺寸进行选择。极性介质的体积2通常具有5 μm ~500 μm 的平均直径范围或0.4pL~400nL的平均体积范围。因此,所述支撑物3中所述区室4的密度依赖于极性介质的体积2的尺寸和所述分隔件6的具体布置。

[0242] 在上述实施例中,所述分隔件6具有规则的重复图案以使所述区室4横跨所述支撑物3具有相同的尺寸和形状并布置于规则的阵列中。这并不是至关重要的。所述分隔件6和区室4横跨所述支撑物3可以可替代地具有不同的形状和/或尺寸和/或所述区室4可以按照

不规则的阵列进行布置。

[0243] 所述极性介质的体积2的所述极性介质的性质如下。

[0244] 所述极性介质可以是亲水性介质。所述亲水性介质可以例如包含水性介质。

[0245] 在一个实施例中,所述体积2的所述极性介质是缓冲剂水溶液。所述缓冲溶液可以包含支持电解质(supporting electrolyte)。

[0246] 所述阵列通过使用如图27中所示的流动池组件可以填充乳液或用非极性的体积和极性体积填充。在图27中,附连于ASIC/PCB 105的阵列101插入到所述阵列保持器102中。所述保护垫圈(protective gasket)107放置于所述阵列的表面上,所述阵列使用螺杆109固定于所述流体模块103。流体可以流过所述阵列的表面,以填充所述区室。阀转子(valve rotor)110可以旋转以流体密封所述流动池。流体如箭头所示从流体储池(未示出)进入所述流动池和离开所述流动池。

[0247] 在所述体积2被布置于所述区室中之前预形成的实例中,所述体积2可以是缓冲水溶液的小液滴。在这种情况下,它们可以以常规的方式,例如,使用如图28所示包含有所述极性介质的第一流动通道41和包含所述非极性介质的第二流动通道42的微流体流T-连接40制成。所述两个流动通道41和42相交于T-连接,从而自发形成小液滴43,其从所述T-连接下游流动并可以作为在所述非极性介质中的小液滴43的乳液收集于容器44中。所述小液滴43的尺寸由极性和非极性流体的流速以及所述各个流动通道41和42的孔宽度决定。图28还显示了已经由T-连接40形成的小液滴43。

[0248] 可以提供小液滴具有不同量的物质,例如,通过向所述第一流动通道提供含有不同极性介质的第三流动通道,其在所述T-连接处相交之前与所述第一通道相交以形成共同流动通道。所述第三和第一流动通道的流速可以变化以提供具有不同组分比的小液滴。

[0249] 在所述体积2在布置于所述区室中之前预形成的另一个实施例中,极性介质的体积2可以是一种水凝胶珠粒,如琼脂糖凝胶。所述凝胶可以包含缓冲水溶液作为液相。所述缓冲溶液可以包含支持电解质。这样的实施例是非交联的或交联的水凝胶如琼脂糖或琼脂糖凝胶(sepharose)。珠粒可以由小液滴例如通过冷却或用UV交联而原位形成。引入到所述非极性介质中的珠粒例如通过融化可以形成小液滴。极性介质的所述体积可以提供于多孔塑料或玻璃珠内。

[0250] 在极性介质的体积2是含水凝胶的珠粒时,它们可以具有足够的刚度以突出所述区室之外。图29显示的装置就是这种实例。在这个实施例中,所述珠粒突出高于所述分隔件6的高度而所述弯月面52如所示形成。

[0251] 这可以是这种情况,当极性介质的体积2是水凝胶的珠粒时,所述区室4之间的漏电流就减小。凝胶珠粒能够按照传统方式在T形件(T-piece)小液滴制作器中通过在升高的温度下合并流股液体凝胶进入所述非极性介质流股中并使其冷却,由此形成凝胶珠粒在非极性介质中的乳液而制成。凝胶珠粒也可能更易于定位于所述孔井中的尖刺电极(spiked electrode)上并一般是更具尺寸稳定性的。

[0252] 在使用凝胶的情况下,可以产生除了球形之外的形状,例如,细长雪茄形结构,其可能应用于深凹槽中(从而最大化极性介质的体积2的所述内部体积)。例如,如果所述氧化还原介体(redox mediator)包含于极性介质的体积2内,这将具有延长极性介质的体积2的寿命的优点。

[0253] 所述水凝胶可以是交联的凝胶。这些是所述基质经过交联的凝胶,其增加了所述凝胶的硬度,提供比未交联的凝胶更高的结构完整性。例如,琼脂糖凝胶可交联。交联的凝胶珠粒是市售的,并可以与非极性介质相混合以形成凝胶珠粒在所述非极性介质中的乳液。一种可能性是具有160 μ m粒径和6.8%~7.2%琼脂糖含量的交联琼脂糖珠粒(正如,例如,可获自WorkBeadsTM200SEC,Bio Works),其是高度多孔的和物理稳定的。所述珠粒可以由制造商提供,并可以通过将所述珠粒引入含两亲性分子的非极性介质中而涂上两亲性层。这也容许制作这种极性介质的体积2的更容易的方法。

[0254] 交联的凝胶也可以提供在制作如下所述的所述装置1期间将极性介质的体积2插入到区室4中的优点。

[0255] 虽然在上述实施例中,单个极性介质的体积2包含于各个区室中,但作为一种替代方案,多个极性介质的体积2可以包含于区室4中。作为这样的例子,图30显示的装置1,其中两个极性介质的体积2提供于单个区室4内。极性介质的体积2定位于彼此的顶部并可以具有包含提供与极性介质的体积2之一接触的其他层50。含两亲性分子的膜可以提供于极性介质的体积2之间的任何界面上,以及极性介质的体积2之一和极性介质的所述层50之间的界面上。离子通道也可以提供于任何这种膜中。将多个极性介质的体积2提供于区室4中,例如,如图30中所示,可以增加相对于所述区室4的体积的所述极性介质的有效量。这就提供了诸如能够提供更大量的介体的优点。

[0256] 所述非极性介质的性质如下。

[0257] 所述非极性介质可以是疏水性介质。

[0258] 所述非极性介质可以包含烃或油或它们的混合物。合适的油包括硅油,AR20或十六烷。所述非极性介质可以基本上与所述体积2的极性介质互不混溶。

[0259] 如上所述将极性介质的体积2的阵列保持于支撑物3中的所述装置1,可以具有宽范围的生物学,医药和其它分析应用。它提供了有助于高通量处理加工小体积2或体积2的组群并可以用于例如区室化反应,细胞分选和筛选应用,例如蛋白质结晶,血液或脊髓液分析和废物处理的机会。寻址(address)和替换所述阵列中极性介质的体积2的能力是重要的方面,例如用于实施关于所述体积2的反应和补充所述阵列。

[0260] 在一些应用中,如上所述将极性介质的体积2的阵列保持于支撑物3中的所述装置1,可以提供如图31中所示的极性介质的层50(这通过举例的方式说明了极性介质的体积2是在非极性介质中的小液滴的情况)。极性介质的所述层50横跨所述支撑物3延伸通过所述区室4的开孔。因此极性介质的所述层50驻留于所述分隔件6上。极性介质的所述层50也接触至少一些极性介质的体积2,优选它们全部。含两亲性分子的膜形成于极性介质的所述层50和极性介质的体积2之间的所述界面51上。

[0261] 为了形成所述含两亲性分子的膜,所述两亲性分子可以最初提供于多个极性介质的体积2、非极性介质所述层或极性介质的所述层50中的任何一种中。在任何这些情况下,当极性介质的所述层50横跨所述支撑物3流动时所述膜可以形成。在所述两亲性分子提供于极性介质的体积2中的情况下,布置于所述区室4中的极性介质的体积2可以在提供极性介质的所述层50之前包含围绕其表面的两亲性分子的层。在所述两亲性分子提供于极性介质的所述层50的情况下,极性介质的所述层50可以在使其接触极性介质的体积2的所述表面上包含两亲性分子的层。

[0262] 当极性介质的所述层50和极性介质的体积2进行接触时,所述含两亲性分子的膜形成于所述界面51上。所述含两亲性分子的膜将极性介质的所述层50和极性介质的体积2分离开。

[0263] 所述层50的极性介质可以是与极性介质的体积2相同的或不同的材料。所述层50的极性介质可以是亲水性的介质。所述亲水性介质可以例如包含水性介质。在一个实施例中,所述层50的亲水性介质包括缓冲剂水溶液。所述缓冲溶液可以包含支持电解质。

[0264] 所述两亲性分子的性质如下。

[0265] 所述两亲性分子可以是能够在极性介质的所述层50和极性介质的体积2之间的所述界面51上形成膜的任何类型。

[0266] 本发明的所述方法和装置适合与许多不同类型的两亲性分子一起使用。

[0267] 在一个实施例中,所述两亲性分子可以包含脂质,其可以具有单一组分或组分的混合物,这在形成脂质双层时是常规的。

[0268] 任何可以形成脂质双层的脂质都可以使用。所述脂质经过选择以形成脂质双层,其具有所需的特性,如表面电荷,支持膜蛋白的能力,填充密度(packing density)或机械性能。所述脂质能够包含一种或多种不同的脂质。例如,所述脂质能够含有最多达100种脂质。所述脂质优选包含1~10种脂质。所述脂质可以包括天然脂质和/或人工脂质。

[0269] 所述脂质通常包括头部基团,界面部分和两个疏水性尾部基团(其可以相同或不同)。合适的头部基团包括,但不限于,中性头部基团,如二酰基甘油酯(DG)和神经酰胺(CM);两性离子头部基团,如磷脂酰胆碱(PC),磷脂酰乙醇胺(PE)和鞘磷脂(SM);带负电荷的头部基团,如磷脂酰甘油(PG);磷脂酰丝氨酸(PS),磷脂酰肌醇(PI),磷酸(PA)和心磷脂(CA);和带正电荷的头部基团,如三甲基铵-丙烷(TAP)。合适的界面部分包括,但不限于,天然的界面部分,例如基于甘油的或基于神经酰胺的部分。合适的疏水性尾部基团包括,但不限于,饱和烃链,如月桂酸(正十二烷酸),肉豆蔻酸(正十四烷酸),棕榈酸(正十六烷酸),硬脂酸(正十八烷酸)和花生酸(正二十烷酸);不饱和烃链,如油酸(顺-9-十八烷酸);和支化烃链,如植烷酰基。所述链的长度和所述不饱和烃链中双键的位置和数目可以变化。所述链的长度和在支化烃链中的所述分支,如甲基基团的位置和数目,可以变化。所述疏水性尾部基团能够连接至所述界面部分,作为醚或酯。

[0270] 所述脂质也能够进行化学改性。所述脂质的头部基团或尾部基团可以进行化学改性。其头部基团已经进行化学改性的合适脂质包括,但不限于,PEG改性的脂质,如1,2-二酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000];官能化的PEG脂质,如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[生物素基(聚乙二醇)2000];和对共轭改性的脂质,如1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰基)和1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(生物素基)。其尾部基团已经进行化学改性的合适脂质包括,但不限于,可聚合的脂质,如1,2-双(10,12-二十三碳二炔酰基)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱;氟化脂质,如1-棕榈酰基-2-(16-氟棕榈酰基)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱;氘代脂质,如1,2-二棕榈酰基-D62-sn-甘油基-3-磷酸胆碱;和醚连接的脂质,如1,2-二-0-植烷基(phytanyl)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱。合适的脂质实例包括但不限于植烷酰基脂质如1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPhPC)和1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPhPE)。然而,这种天然的脂质,例如,通过蛋白质或洗涤剂易于生物降解并且不能够承受高电压。优选所

述两亲性的层是非天然的。两亲性聚合物膜由于其承受更高电压的能力而优于脂质膜。

[0271] 在另一个实例中,所述两亲性分子可以包括含有第一外亲水基,疏水核基团和第二外亲水基团的两亲性化合物,其中所述第一和第二外亲水基团每一个都连接至所述疏水核基团。

[0272] 一些这种两亲性的化合物公开于与本申请同天提交的题目为“Droplet Interfaces”的国际专利申请[ONT Ref:ONT IP 039]中,其结合于本文中作为参考。

[0273] 其它这种两亲性化合物公开于US-6,916,488中,其结合于本文中作为参考,并公开了许多能够用于所述装置1中作为平面两亲性膜的聚合物材料。具体而言,公开了三嵌段共聚物,例如,硅三嵌段共聚物膜,如聚(2-甲基噁唑啉)-嵌段-聚(二甲基硅氧烷)-嵌段-聚(2-甲基噁唑啉)(PMOXA-PDMS-PMOXA)。

[0274] 使用这种三嵌段共聚物作为本发明中的两亲性膜由于其承受高电压的能力,其鲁棒性(robustness)以及其承受来自洗涤剂 and 蛋白的生物降解能力是尤其优选的。其承受生物降解的能力允许生物样品如例如血液或血清对所述阵列的直接施用和测定。施加到所述顶表面的所述极性层可以是要测定的样品。可以使用的硅酮三嵌段聚合物的实例是7-22-7PMOXA-PDMS-PMOXA,6-45-6PMOXA-PE-PMOXA和6-30-6PMOXA-PDMS-PMOXA,其中所述命名法是指亚基的数目。例如,6-30-6PMOXA-PDMS-PMOXA是由30个PDMS单体单元和6个PMOXA单体单元构成的。

[0275] 根据所述两亲性分子的性质,所述膜可以是所述两亲性分子的双层或可以是所述两亲性分子的单层。

[0276] 一些在所述装置1中形成体积2的阵列的可能方法如下。

[0277] 首先,提供包含如上所述布置的所述支撑物3的装置1。

[0278] 在第一类型的方法中,极性介质的体积2预形成于所述非极性介质中之后才布置于所述区室中。现在将描述这种类型的方法的实例,其中首先使用以上提及的方法制备在非极性介质中的极性介质的体积2的乳液。

[0279] 所述两亲性分子可以提供给极性介质的所述体积2或所述非极性介质。这可以通过将所述两亲性分子加入到所述乳液中,因此当它们迁移至极性介质的所述体积2和所述非极性介质之间的界面上时就可以简单地实现。可替代地,所述两亲性分子可以加入到所述非极性介质中之后才形成所述乳液。

[0280] 为了将所述极性介质和所述非极性介质布置于所述支撑物3上,所述乳液流过所述支撑物3。这具有的效果是所述非极性介质流入所述区室4中,以及所述非极性介质中的极性介质的各个体积2通过所述开孔进一步流入至少一些区室4中。这已然发现,通过如上所述对所述支撑物3设计进行辅助,随着所述乳液流过所述支撑物3的上表面而自然地发生。所述非极性介质和极性介质的体积2通过毛细作用力抽进所述阵列中。此外,在区室4之间具有间隙的支撑物2中,所述非极性介质通过所述间隙在区室之间流动。

[0281] 所述乳液通常含有比区室数目更多的极性介质的体积2以确保相对大比例的所述区室4填充(populate)极性介质的体积2。所述过量的极性介质的体积2可以通过用所述非极性介质冲洗所述支撑物3而除去。所述冲洗将极性介质的体积2保留在所述区室中并随着非极性介质的层延伸穿过所述开孔与极性介质的所述体积2接触,保留下适用于冲洗的所述非极性介质的层。

[0282] 在这种方法中,所述乳液还可以包含所述两亲性分子。这在极性介质流动穿过所述支撑物中的开孔以形成含极性介质的层时有利于膜的形成,如下所述。所述两亲性分子的存在也稳定了所述乳液。

[0283] 所述体积2的所述极性介质和非极性介质的相对粘度可以选择充分相似以使确实使所述乳液流过所述支撑物3的所述极性介质的体积2不会远离所述支撑物3而漂浮于所述非极性介质的表面上。然而,应注意,通常情况下极性介质的体积2会通过毛细作用力拉拔和保持于所述区室4中,从而即使使用密度高于极性介质的体积2的非极性介质,极性介质的所述体积2倾向于保留在所述电极表面处在所述非极性介质中。

[0284] 这种方法本质上也提供了包含以下各项的层:横跨所述区室4的开孔延伸与所述区室4中的极性介质的所述体积2接触的非极性介质,这是所述乳液的所述非极性介质,或用于冲洗所述支撑物3的所述非极性介质。

[0285] 染料可以引入到极性介质的体积2中以使所述阵列中的小液滴存在可以更易于可视化。着色染料,优选与加入到极性介质的体积2的具有不同的颜色,可以加入到所述非极性介质中以更容易地可视化所述非极性介质横跨所述支撑物3的分布。染料引入极性介质的体积2和/或非极性介质中,可以用作制作期间的质量控制检查以确保所述区室4充分填充极性介质的体积2和/或所述非极性介质适当地分布。

[0286] 当极性介质的体积2是水性交联凝胶珠粒时,所述乳液可以正压下流过所述支撑物3。这是可能的,因为所述交联的凝胶更硬并且能够承受所述压力,其关于所述交联凝胶的机械性能进行选择。与此相反,凝胶珠粒和溶液的小液滴可能具有在压力下发生变形和融合的更大的趋势。使用这种正压力有助于填充所述区室4。这在使用一般而论是更难以填充的具有所述第一替代构造或所述区室之间无间隙的其它构造的支撑物时是尤其有利的。

[0287] 在极性介质的体积2预先形成于非极性介质中的第一类型的方法的另一个实例中,所述含极性介质的体积可以,例如,通过声学小液滴注射,直接分散到各个区室中。利用这种技术,所述分散可以进行控制,以分散正确数量的含所述极性介质的体积,而不需要除去过量的体积。在这种技术的一个实施方式中,所述基底3包含区室4,在所述分隔件中没有间隙,在这种情况下,合乎需要的是极性介质的体积2的宽度小于所述区室4的所述开孔的宽度。所述体积2可以由极性介质构成或包含在非极性介质中的极性介质。在另一个实施方式中,所述基底3包含的区室4在所述分隔件6中具有间隙8,其中所述间隙8从所述开孔完全延伸至所述支撑物3的所述基座5。在另一个实施方式中,所述基底3包括的区室4在分隔件6中具有间隙8,其中所述间隙可以从所述开孔部分地延伸到所述基座5。在所述间隙从开孔完全延伸到所述支撑物的所述基座的情况下,预处理可以有利地增加到所述支撑物,之后才加入所述体积,以便限定所述小液滴并防止其合并。

[0288] 在第二种类型的方法中,极性介质的体积2在所述区室4中由更大量的流入所述池中的极性介质形成。这种方法的实例现在将参照图32a至图32i~图34a至图34b的示意性流程图进行描述,其显示的是所述方法的连续步骤中的所述支撑物3。在图32a至图32i中,所述支撑物3是以上所描述的类型,其中所述分隔件6包含了限定内部凹陷21的无间隙内部部分20和具有空隙23的外部部分21。在图32a至图32i中,所述支撑物3示意性地图示说明,并例如能够是以上所述的第二至第十一种替代构造的任何一种。

[0289] 首先所述支撑物3按照如图32a中所示提供。

[0290] 所述支撑物3用预处理非极性介质70(图32b中所示)进行预处理。所述预处理非极性介质70可以是与随后如以下所述施加的非极性介质的所述层相同或不同的材料。

[0291] 所述预处理非极性介质70(其可以稀释于溶剂中)(例如用移液器)添加至所述基底3并容许通过毛细作用横跨基底铺展。所述预处理非极性介质70汇集于所述内部凹陷22的角落并围绕所述外部部分21的所述支柱23,特别是汇集于所述支柱23和所述内部部分20的所述上表面之间的角落。

[0292] 接着,极性介质71和非极性介质74如下布置于所述支撑物3上。

[0293] 极性介质71横跨所述支撑物3流动以使所述极性介质71通过所述开孔进入所述区室4中,如图32c中所示。这样做的一种方式是将所述装置1的一端附连至流动池60。所述电极13至少一部分是无非极性介质的,因此极性介质的体积2与所述电极13电接触。

[0294] 与极性介质的所述体积2和所述非极性介质一起布置于所述支撑物3上(例如,在乳液中)的所述第一类型的方法相反,本文中非极性介质的所述层随后提供。

[0295] 过量的极性介质71通过将具有与所述极性介质不同的相的替换流体(displacement fluid)流过所述基底3而除去,在所述区室4中保留下所述含极性介质的体积2。对此的两种替代方法都进行了描述。

[0296] 第一种方法举例说明于图32d和图32e中。在第一种方法中,所述替换流体是如图32d中所示流过所述基底3的非极性介质74。所述极性介质71的剪裁(clipping)发生于所述内部部分的外边沿,如图32e中所示。

[0297] 极性介质的所述体积如图32j所示发生松弛而将所述含极性介质的体积2保留于所述区室4中。这种第一方法使含非极性介质的层73延伸穿过所述区室4的所述开孔与所述含极性介质的体积2接触。

[0298] 第二种方法在图32f至图32i中举例说明,其步骤代替图32d和图32e发生。在第二种方法中,所述替换流体是如图32f中所示流过所述基底3的气体72。极性介质71的剪裁发生于所述内部部分的所述外边沿,如图32g中所示,在所述区室4中保留下所述含极性介质的体积2,所述气体72的层延伸穿过区室4的所述开孔与所述含极性介质的体积2接触,如图32h所示。所述气体72优选是惰性的,并且可以是空气或任何其它气体。

[0299] 此后,非极性介质74流过所述基底3,如图32i中所示,代替所述气体72以提供含非极性介质的层73延伸穿过所述区室4的所述开孔与所述含极性介质的体积2接触,如图32j中所示。作为一种正流动的替代物,非极性介质74的所述层73能够使用一些其它技术如喷雾横跨所述基底3上提供。

[0300] 在所述第一和第二方法的每种方法中,所述替换流体横跨所述支撑物3流动,通过所述外部部分23的所述间隙,因此刮过所述区室4的所述开孔以取代或剪裁掉所述过量的极性介质。因此,所述外部部分23和所述内部凹陷22的几何形状和物理性能,包括当所述凹口65存在时的作用,会控制将极性介质的体积2布置于所述内部凹陷22中的过程。极性介质的体积2的剪裁有效性和最终形状是由许多因素决定的,如所述外部部分23和内部凹陷20的相对高度,所述内部凹陷20的纵横比。所述分隔件6的所述内部凹陷22和所述外部部分23的尺寸理想地经过选择以使所述含极性介质的体积2形成如图32h和图32j中所示横穿所述内部凹陷22的弯月面。

[0301] 通过举一个反举例,图33a显示了对应于图32a至图32i的步骤的方法的步骤,不同

的是相比于图32a至图32i所述支撑物3具有更大的支柱高度/内部凹陷深度的比率。由于所述支柱高度增加,由所述替代流体74剪裁所述极性介质发生于所述支柱的外边沿15(与所述内部凹陷的所述外边沿10相对),如图33e所示。这导致更大体积的极性介质会保留于所述区室4中,如图33f所示。由于所述区室中所述极性介质的体积增加,在所述极性介质流过所述支撑物之后形成更大的界面,如图33h中所示。一般而言,所述膜界面越小,噪声和电阻就越低。因而,如图32a至图32i的所述方法中所示的膜界面相比于如图33a至图33h的所述方法中所示的膜界面是优选的。

[0302] 关于几何形状的具体尺寸,应该注意的是,所述最佳尺寸很大程度上取决于所述材料系统,包括所述基底3,所述非极性介质和所述极性介质的材料的相应表面能。还因为填充是动态过程,这也在一定程度上取决于流过所述基底3的流速。因此,所述优选的尺寸取决于材料系统。本文中的任何参考的具体尺寸都适用于所述基底3是环氧树脂TMMS,所述非极性介质是硅油AR20以及所述极性介质是1M KC1的材料系统。

[0303] 作为使极性介质71流过所述支撑物进入所述区室4中随后通过流动替代流体除去所述过量的极性介质的一种替代方式,所述体积2能够通过将离散的极性介质的体积2通过空气注入所述区室4中,例如,使用印刷技术而布置于所述支撑物上。在这种情况下,所述非极性介质74随后就布置于所述支撑物上。

[0304] 所述预处理非极性介质70在形成极性介质的体积2中还具有有益的作用。

[0305] 首先,在区室4在其间具有间隙的情况下,所述预处理非极性介质70位于所述间隙中并且将其密封以避免极性介质流动。这通过降低邻近区室中的所述体积发生接触和合并的趋势而有助于形成离散的极性介质的体积。

[0306] 其次,所述预处理非极性介质70还可以用于涂覆所述支撑物3并可以以一种有利的方式改变所述表面性能。根据所述支撑物3的表面性能和所述预处理非极性介质70的性质,加入预处理非极性介质70可以改变所述支撑物3和布置于区室中的极性介质的体积之间的接触角。所述预处理非极性介质70可以,例如,用于增加所述支撑物3对所述极性介质的拒斥性并提供具有更凸形状的体积。使用预处理将所述支撑物3的拒斥性改变至所需水平允许使用更宽数量的材料考虑用于制作所述支撑物3。例如,这在从制作角度特定材料是合乎需要的而并不具有合适的材料特性的情况下可能是有用的。

[0307] 所述内部凹陷22的纵横比是重要的考虑因素。纵横比(长度:宽度)过大,可能导致预处理非极性介质70(如图34b中所示横跨所述电极13)形成弯月面。如果纵横比(深度d:宽度w)过小,则剪裁可能导致极性介质从所述区室中移除。理想的是,所述内部凹陷22具有一定深度/宽度比,其中内部凹陷的宽度定义为能够容纳于所述内部凹陷22中的最大理论球体的直径,即至少为1:3,优选至少2:3。理想的是,所述内部凹陷22具有的深/宽比,其中内部凹陷的宽度定义为能够容纳于所述内部凹陷中的最大理论球体的直径,即至多3:1,优选至多3:2。

[0308] 剪裁的有效性和极性介质的所述体积的最终形状决定于许多因素,如所述外部部分高度(h),所述内部凹陷的深度(d),所述内部凹陷的宽度(w)和相应外部部分和区室的内部凹陷之间的长度(l)的相对值,如图34a所示。形成所述阵列的最佳尺寸也取决于各种因素,如所述支撑物,所述非极性介质和所述极性介质的材料的相对表面能。形成阵列的过程还取决于所述非极性和极性介质流过所述支撑物的流速。

[0309] 现在将描述第二种方法的计算机模拟。

[0310] 图35显示了计算机模拟的起始点,其中所述基底3已经用预处理非极性介质70,在这个实施例中是油,进行了预处理,并随后填充极性介质71,在这个实施例中是缓冲水溶液。图35还显示了所述非极性介质74的前部流过所述基底3之前在其起始点。

[0311] 图36a和图36b显示了所述非极性介质74流过所述基底3之后的计算机模拟,图36a显示了初始状态而图36b显示了所述系统已经容许松弛之后的稳定状态。图36b显示了极性介质的体积2已经销钉(pin)于所述内部凹陷22的表面上。

[0312] 图36c显示了包含极性介质的体积2的所述基底的区室4的共焦图像。正如通过所述计算机模拟预测的,极性介质的体积2已经销钉于所述内部凹陷22的表面上。

[0313] 图37显示了在对具有130 μm ,110 μm 和90 μm 宽度的内部凹陷22的模拟中从初始到稳态的松弛,类似于图36a和图36b,所有这些都表明极性介质的体积2销钉于所述内部凹陷22的表面上。这些结果还表明,极性介质的体积2的弯月面,在其与所述非极性介质的界面上,并未突出到所述内部凹陷22边沿之上,这有助于实现膜尺寸的控制。

[0314] 图38a和图38b是显示图21的构造中,极性介质(在这种情况下是缓冲水溶液)的体积2的形成的图像。观察到极性介质的均匀体积2,销钉于所述内部凹陷22的表面上。

[0315] 图39a和图39b是显示图19的构造中,极性介质(在这种情况下是缓冲水溶液)的体积2的形成的图像。观察到极性介质的均匀体积2,销钉于所述内部凹陷22的表面上。

[0316] 所述预处理非极性介质70可以包含所述两亲性分子,但这会具有所述两亲性分子提供横跨电极13的电绝缘层的风险,所以优选所述预处理非极性介质70并不包含所述两亲性分子。

[0317] 所述含非极性介质的层73可以包含两亲性分子。所述流过所述基底3的非极性介质74可以包含所述两亲性分子。可替代地,流过所述基底3的非极性介质74可以不包含两亲性分子以使所述最初提供的层73同样并不包含所述两亲性分子,在这种情况下,所述两亲性分子可以随后添加到所述含非极性的层73中。

[0318] 在任何这些情况下,在形成所述含非极性介质的层73之后,所述装置1放置一段时间以容许所述两亲性分子迁移到所述含非极性介质的层73和所述含极性介质的体积2之间的界面上。通常情况下,所述装置1可以温育30min等级的一段时间。

[0319] 作为另一替代方式,所述两亲性分子可以提供于随后如下所述流过所述支撑物3的极性介质75中。使用所述装置1形成膜阵列的方法通过上述的方法形成体积2的阵列进行实施,并随后实施以下步骤。这些步骤在图32a至图32i中对于形成极性介质的体积2的阵列的那种方法进行举例说明,但一般可适用于任何形成本文所述的极性介质的体积2的阵列的方法。

[0320] 极性介质75流过所述支撑物3以覆盖所述区室的开孔,如图32k所示。所述极性介质置换出所述含非极性介质的层73的非极性介质以形成延伸穿过所述支撑物3中的开孔的含极性介质的层76,如图32i中所示。图40c显示了更详细的视图。使所述含极性介质的层75与所述含极性介质的体积2接触,与每个所述含极性介质的体积2形成界面77。

[0321] 在所述两亲性分子已经存在的情况下,含两亲性分子的膜78形成于这些界面77上。这通过将所述极性介质75简单地流过所述支撑物3就会发生。

[0322] 可替代地,所述两亲性分子可以提供于随后流过所述支撑物3的极性介质75中。在

这种情况下,在形成所述含极性介质的层75之后,所述装置1保持允许所述两亲性分子迁移至含极性介质的层75和含极性介质的体积2之间的所述界面77的一段时间,由此形成了所述膜78。通常情况下,所述装置1可以温育30min等级的一段时间。图31显示了极性介质的体积2是在使用如上所述的乳液引入到所述区室4中的非极性介质中的小液滴的情况的等效实施例,显示的所述极性介质的层50按照相同的方式通过极性介质流过所述支撑物3而形成。

[0323] 所述外部部分23的几何形状和物理性质,包括当存在时所述凹口67的作用,会控制所述延伸穿过所述支撑物3的含极性介质的层75的几何形状。所述内部凹陷22的尺寸和所述分隔件6的所述外部部分23根据所述内部凹陷22的尺寸进行选择以使所述含极性介质的体积2形成横跨所述外部部分23的弯月面,如图321所示。所述含极性介质的体积2和所述含极性介质的层75的弯月面朝向彼此延伸至使其相互接触的程度。因此,所述几何形状控制所述膜78的形成从而提供形成的可靠性。这还允许控制所述含两亲性分子的膜78的尺寸和稳定性。

[0324] 因此,所述支柱与所述内部凹陷的相对高度是一个设计考虑要素。在所述基底2由环氧树脂TMMS制成,所述非极性介质是硅油AR20而极性介质是1M KCl的具体材料系统的情况下,当所述支柱的高度为60 μ m而所述内部凹陷的高度为90 μ m (1:1.5)时,对极性介质的体积2的裁剪发生于所述隔板6的上边沿,这就产生了从所述内部凹陷突出的极性介质的体积2。这就产生了具有大的膜面积(大界面)的“松饼(muffin)”形小液滴。虽然这种膜能够发挥作用,但它不是理想形状,因为更大的膜易于出现更多的泄漏,会具有更高的电容以及往往产生更多的电噪音。在上述的材料系统的情况下,所述支柱与所述内部凹陷30:90和30:120的高度比已经证明是有效的。

[0325] 通过举例方式,图40a和图40b是具有图19的构造的支撑物3的图像,其中膜已经在所述极性介质是缓冲剂水溶液的情况下形成。

[0326] 所述装置1在有或无极性介质的所述层75下,从生产设施至所述装置的使用点在储存中或运输期间都能保持这种状态。极性介质的所述层50(如果尚未存在)在这种储存或运输之后可以应用。

[0327] 在极性介质的所述体积2作为乳液中的小液滴预先形成的形成极性介质的体积2的第一类型的方法中,为了将所述小液滴引入所述区室4,它们需要提供于相当窄的粒度分布的范围内,因此,对于所述乳液有必要是稳定的。稳定乳液的形成可以通过形成小液滴和非极性介质之间的界面的两亲分子的存在而实现。在不存在两亲分子下,所述乳液是不稳定的。这往往会导致一定程度的小液滴合并以形成无法正确适配于所述区室4中的更大的小液滴。

[0328] 然而,对于提供稳定乳液的所述方法的一个潜在缺点是在填充所述区室4的过程中,所述非极性介质趋向于涂覆提供于每个区室4中的所述电极13的表面从而导致所述电极13与极性介质的体积2之间产生电阻抗的层。如果期望传感诸如跨膜的粒子流的电信号,则所述电极13和极性介质的体积2之间的电接触可以是必需的必要条件。两亲性分子在横跨所述电极13的所述层中的存在进一步加剧了电接触不良的问题。由于非极性和极性基团的同时存在,就很难从所述电极13的表面通过修改其表面特征而置换出两亲分子。

[0329] 第二类型的方法可以通过在不存在两亲性分子下在所述区室4中组装极性介质的

各个体积2而用于减少不良电接触的问题。所述添加至所述基底3的非极性介质主要定位于所述分隔件6的表面上而远离所述电极13。因此,所述预处理非极性介质70可以进一步包含所述两亲性分子,以使所述含两亲性分子的膜形成于所述极性介质8流过所述支撑物3而置换出非极性介质并形成极性介质层的步骤之后。

[0330] 然而,如果所述预处理极性介质70不包含两亲性分子,则极性介质的所述体积2在不存在稳定作用的两亲分子下进行组装,因此邻近区室之间的体积的合并更是一个问题。因此,半-封闭结构由于所述各个体积受限于所述孔井内的事实而是优选的(包含分隔件的结构没有或具有少量的提供于孔井表面上的间隙)。然而,所述方法由于所述预处理非极性介质70根据所述支柱之间的分隔情况能够部分跨越所述分隔件之间的所述间隙由此有效提供半封闭结构的事实,对于开放式结构(支柱具有超出所述区室高度的间隙)也将一定程度上发挥作用。

[0331] 所述装置1可以具有插入到包含形成于所述界面51上的两亲性分子的膜中的膜蛋白。所述膜蛋白可以是离子通道或孔。

[0332] 这种膜蛋白(能够插入到含两亲性分子的膜中)在使极性介质所述层50与极性介质的体积2接触之前可以首先提供于极性介质的所述层50和极性介质的体积2中任一种或两者之中。在一些材料系统中,使极性介质的所述层50与极性介质的体积2接触以形成所述含两亲性分子的膜可能会导致所述膜蛋白自发插入到所述膜中。所述膜蛋白插入所述膜中能够在必要的情况下例如通过诸如横跨所述膜2施加电位差的方式而进行辅助。

[0333] 可替代地,所述膜蛋白可以提供于所述非极性介质中。

[0334] 所述膜蛋白可用于实施对极性介质的所述层50中的样品的分析。

[0335] 为了有助于此,极性介质的所述层50可以在其最初添加之时包含待分析的所述样品。作为替代方式,极性介质的所述层50如上所述可以在没有待分析的样品下提供。这允许所述装置能够制备用于使用之前的存储和运输。在这种情况下,在实施所述分析之前,可以实施用包含所述待分析的样品的极性介质的其它层置换极性介质的所述层50的步骤。

[0336] 膜蛋白(是一种离子通道),可以用于通过测定横跨所述离子通道施加的电位差之下的电流来测定穿过所述离子通道的分析物的易位。所述膜本身是高电阻的,以及通常具有 $1\text{G}\Omega$ 等级或更大的电阻。因而,离子流基本上通过所述离子通道唯一发生。以举例的方式,图41显示了为测定通过MspA纳米孔的离子电流而获得的电数据,说明孔插入。

[0337] 所述离子通道可以是用于确定多核苷酸序列的纳米孔。所述电流可以进行测定,其中每一电流事件(current episode)的幅度和持续时间可以用于确定所述序列。所述阵列可以包含控制多核苷酸易位通过纳米孔的酶。

[0338] 所述离子通道可以提供于极性介质的体积2外部的极性介质的所述层50中。有可能不只一个离子通道可以插入到所述膜中或根本没有插入。在实践中,所述膜中将会存在离子通道的泊松分布。在离子通道的插入之后,所述膜可以,例如通过测定通过所述通道的离子流进行测定,以确定哪些膜包含单个离子通道。包含单个通道的小液滴可以选出用于进一步的实验。含单个离子通道的小液滴界面的百分比可以通过改变离子通道在所述极性介质中的浓度而进行优化。

[0339] 可替代地,所述离子通道可以提供于所述非极性介质中。离子通道在膜中形成可以通过例如将荧光团提供于所述小液滴的极性内部部分中以及将淬灭剂提供于所述极性

弯月面层中进行光学检查。如果离子通道存在于所述界面51上的所述膜中,所述淬灭剂和荧光团会来到彼此紧靠附近,淬灭所述荧光信号。

[0340] 离子流的幅度取决于横跨所述离子通道施加的电位差因此合乎需要的是提供稳定的参考电位。所述氧化还原电偶的两个成员都是需要的,以提供稳定的参考电位。然而,可以提供一个成员而另一成员,例如,通过所述现有的氧化还原成员的氧化或还原而原位产生。

[0341] 电测定可以如下进行。

[0342] 所述装置1进一步包括布置于所述支撑物3上方如图31所示的公共电极60,从而使所述公共电极60与极性介质的所述层50电接触(一旦其已经提供)。

[0343] 正如图42中所示,所述装置1进一步包括所述公共电极60和每个区室4中的相应电极13之间连接的电路61。所述电路13经过布置以进行所述电测定并可以具有,例如,结合于本文中作为参考的W0-2009/077734中更详细讨论的传统结构。

[0344] 所述电路61经过配制以根据在或通过所述膜发生的过程进行电测定。在含有分析物的样品提供于,例如,极性介质的所述层中的情况下,所述过程可以分析所述样品。施加于所述支撑物3的所述层50的极性介质可以是,例如,待分析的液体样品。这种样品可以是生物样品如血液,血清,尿,间质液,眼泪或精子。所述液体样品可以衍生自固体或半固体样品。所述样品在来源上可以是农业的,环境的或工业的。它可以是法医样品。

[0345] 电化学测定装置典型地包括工作电极,反电极和参考电极,其中恒电位器(potentiostat)测定所述工作电极和参考电极之间的电位差并测定所述工作电极和反电极之间的电流。因为没有电流发生穿过所述参考电极,则恒定电位差维持于所述参考电极和工作电极之间。可替代地,可以使用两个电极的系统,这就是采用所述装置1的那种情况,其中电位提供于反电极和反电极/参考电极之间以及离子流发生于这些电极之间。然而,这会根据所施加的电位的极性导致所述氧化还原电偶的一个或另一个成员的消耗。所述氧化还原成员的消耗速率取决于离子流的幅度(magnitude)。

[0346] 在测定多核苷酸易位的情况下,会促使所述多核苷酸在横跨所述孔施加的正电位下易位穿过所述孔。施加正电位会导致所述氧化还原电偶的一个成员氧化,其最终会被耗尽。一旦氧化还原成员发生耗尽,所述参考电位就开始漂移,因此限制了所述测定的寿命。在所述氧化还原电偶的一个或两个成员提供于所述小液滴中的情况下,所述测定的寿命取决于所述氧化还原电偶的所述还原成员的量,而这进而取决于所述氧化还原成员的浓度和所述小液滴体积。

[0347] 所述装置1提供了在其上可以原位形成的膜的极性介质的体积2的稳定阵列。这种阵列具有优于包括横跨其上提供悬浮两亲性膜的各个孔的阵列的装置的优点。在后一种情况下,有可能随着时间推移在所述膜边沿可能发生泄漏。相比之下,包含于非极性介质之中的极性介质的体积2是非常稳定的。由三嵌段共聚物形成的两亲性膜是非常稳定的且抗生物降解的。然而,已经证明很难通过诸如描述于W02009/077734中的方法横跨微孔并孔的阵列提供由三嵌段共聚物,尤其是硅三嵌段共聚物制成的两亲性膜。与此相反,制备硅三嵌段小液滴却是相对直接的。这能够提供的纳米孔阵列,具有非常稳定的膜,并具有低的生物进攻易感性。这也能够将样品如生物样品直接施加至所述两亲性膜上。

[0348] 所述装置1通常是一次性使用的。然后,所述装置1的组分,即所述生物样品,极性

介质的体积2和非极性介质都可以简单地从所述支撑物3移出,而所述支撑物3经过清洁,用极性介质的体积2和非极性介质进行重新填充(repopulate)。这允许再利用所述硅芯片和包含所述阵列和所述电极的所述电极阵列,这都是所述阵列芯片的昂贵组件。它还允许补充所述氧化还原电偶。

[0349] 具体的应用是所述装置1容纳于适用于诸如手提电脑的计算设备的一次性手持式器件中。数据由所述器件产生并通过USB或其它传送装置传送到所述计算设备。所述计算设备一般包括通过其生成事件和基础调用数据(base calling data)的已经储存的算法。

[0350] 可替代地,所述装置1能够容纳于可再利用的器件中,其中所述器件包括流动管道,允许所述阵列通过用储存于板上(on-board)的流体储液池中的溶液进行冲洗而进行清洁。

[0351] 考虑到电的要求,所述电极13可以如下进行布置。

[0352] 所述电极13提供与极性介质的体积2电接触,并可以使用以提供横跨所述两亲性分子膜的电位差。电连接可以从所述电极13延伸通过所述支撑物3至电路。

[0353] 所述电极13可以是任何形状,例如,圆形。各个电极13可以横跨区室4的整个宽度或其部分宽度延伸。在一般情况下,所述电极13可以突出超过所述基座5或可以与所述基座5是一体的。

[0354] 所述区室4的一些或所有表面可以是疏水性的,包括所述区室4内部的所述分隔件6的外表面。这有助于将极性介质的体积2定位于电极13上由此有助于电接触。

[0355] 所述电极13可以包括有助于与极性介质的体积2电接触的其它特征。

[0356] 一种选择是对于所述电极13的所述暴露表面可以,例如,通过在Pt电极上提供Pt黑的层而粗糙化。

[0357] 另一种选择是对于所述电极13包含突出进入所述区室4中以穿透极性介质的所述体积的尖刺(spike)16。在通过尖刺16穿透极性介质的体积2之后,其倾向于围绕所述电极重新形成以有效再密封极性介质的体积2。

[0358] 所述电极13的暴露表面可以是亲水性的和/或围绕所述电极13的所述区室4的表面可以是疏水的,例如,所述表面涂层14的所述暴露表面。这能够降低所述非极性介质涂覆所述电极的所述暴露表面的趋势,并由此起到电绝缘层的作用。

[0359] 所述电极13可以是参考电极如Ag/AgCl以相对于反电极提供稳定的参考电位。可替代地,所述电极13可以是电化学惰性材料,如Au,Pt,Pd或C,以及所述电极电位通过位于所述小液滴的所述极性内部中的氧化还原电偶的一个或两个成员提供。可以使用的氧化还原电偶类型是,例如,Fe(II)/Fe(III),Ru(III)/Ru(II)和二茂铁/二茂铁盐(ferrocenium)。可以使用的氧化还原电偶具体实例有铁/亚铁氰化物,六胺化钨和二茂铁单羧酸。

[0360] 图43显示了对于亚铁/铁氰化物作为所述氧化还原电偶的各种小液滴直径的小液滴寿命。正如从图中可以看出,在200 μ m直径的小液滴中浓度200mM的亚铁氰化物对于100pA的电流具有大约140h的寿命。

[0361] 所述支撑物3如下设计以有助于形成两亲性分子的膜。

[0362] 正如图31中所示,极性介质的所述层50形成的弯月面57,其突入所述区室4中接触极性介质的体积2。如上所述支撑物3的所有构造提供的优点是,所述分隔件6的上表面有助

于形成和销钉所述弯月面52。具体而言,所述分隔件6上表面的各种卷曲(convoluted)形状为极性介质的所述层50提供了销钉点,以形成所述弯月面52。

[0363] 形成于传统方形孔井结构中的弯月面并未均匀销钉于所述孔井边沿周围。因此,所述弯月面上的应力产生于所述孔井的角落。为了优化孔井类型结构中弯月面的形成,有益的是在所述孔井上提供进一步的特征以销钉所述极性层。如上所述的支撑物3的所有构造提供了这样的特征,例如所述各支柱7和23的卷曲形状和围绕所述凹部30的所述共用本体31的波纹形状。所述弯月面52可以销钉于这些波纹周围,有效地在所述区室4中产生了更多分布的销钉弯月面52。

[0364] 总体而言,这样销钉作用实现于以上所述的支撑物3的构造中,因为在每种情况下共面内的所述分隔件6外端边沿的每区室4的总长度大于所述区室4中能够容纳的最大理论球体的最大周长。

[0365] 极性介质的所述层50与所述分隔件6形成所述弯液面52,所述分隔件6延伸进入所述区室4并接触提供于其中的极性介质的体积2以形成膜。所述区室4设计的开孔具有的尺寸经过选择以使极性介质的所述层当施加时将会形成弯月面52,其延伸进入所述区室4中达到使极性介质的所述层50与至少一些极性介质的体积2接触的程度。

[0366] 形成膜的能力依赖于所述区室4中极性介质的体积2的高度和所述弯月面52延伸进入所述区室4中的程度。这进而取决于所述分隔件6,极性介质和所述非极性介质之间的所述表面相互作用,以及通过所述分隔件6限定的所述区室4的尺寸和形状。这些参数,和/或极性介质的体积2的尺寸,可以经过选择以使施加至所述支撑物3顶表面的极性介质将会自发地与极性介质的体积2形成膜。

[0367] 这对于极性介质的体积2是在非极性介质中的小液滴的情况示意性地图示说明于图44a至图44c中。图44a显示了极性介质的所述层50与极性介质的体积2之间没有接触以使由于极性介质的体积2太小和/或所述弯月面52没有充分延伸进入所述区室4中未形成膜的情况。

[0368] 图44b显示了极性介质的体积2和弯月面52由此正好彼此接触的情况。然而,膜的尺寸可能不充分。另外,所述膜形成可能对于其他参数敏感。极性介质的体积2的尺寸是温度依赖性的并且温度的小下降可能使极性介质的体积2收缩以导致膜未形成。此外,虽然极性介质的体积2经过设计尺寸上基本相同,但是可能会发生小液滴尺寸的小变化,导致形成不可靠的膜。

[0369] 图44c显示了极性介质的体积2制成较大和/或所述弯月面52进一步延伸进入所述区室4中以形成显著的小液滴界面的情况。这会降低所述膜不会形成以及为离子通道插入提供大表面积的机会。

[0370] 图45和46是对于极性介质的体积2是在非极性介质中的小液滴的情况,图15~图18中所示类型的所述装置1的示意性横截面视图,其中所述分隔件6包括内部部分20和包含其间具有间隙24的支柱23的外部部分21。图45和图46显示了所述支柱23的高度和密度对所述弯月面52的销钉作用的影响。

[0371] 在图45中,所述弯月面52销钉于所述内部部分20的边沿,而不是所述支柱23上。其他非极性介质销钉于所述支柱23和所述内部部分20的所述凹槽22的所述边沿之间的界面上。因此,所述支柱23用于控制非极性介质的分布,而并未影响由所述凹槽22控制的所述弯

月面52的形成。

[0372] 在图46中,所述支柱23如此布置以使所述弯月面52由所述支柱23本身而非所述内部部分20中的所述凹槽22确定。在图46中,两组支柱23提供于所述分隔件4的所述内部部分上的相邻区室4之间。可替代地,例如,可能提供单个支柱,其具有比图1中所示的支柱更大的高度。

[0373] 根据图45或图46的情况是否形成所述弯月面52将取决于所述外部部分21的所述支柱23和所述内部部分20的所述凹槽22的布置和相对尺寸。

[0374] 所述分隔件6之间没有间隙的区室4具有被非极性介质淹没的趋势。这是不利的,因为这会阻止所述亲水性介质的所述两个体积2之间的膜界面形成。

[0375] 图47显示了由极性液体在所述支撑物3的表面上形成的弯月面52。施加于所述支撑物3的上表面的极性介质的所述层50的所属弯月面52的尺寸和曲率度能够控制于很宽的范围内。所述弯月面52的曲率将由所述极性液体和所述分隔件6之间的接触角确定,所述接触角是所述极性介质,所述非极性介质和所述分隔件6的表面性能的材料系统的性质。它也将通过横跨其上形成所述弯液面52的所述区室4的所述开孔的尺寸和所述分隔件6的高度确定。

[0376] 例如,对于具有所述分隔件6之间的宽度b,高度c和所述支柱的表面和所述弯月面(meniscus) 52之间的接触角 θ 的区室4,当满足以下条件时弯月面52将在所述区室基座上形成:

$$[0377] \quad \frac{c}{b} \leq \frac{1 - \sin \theta}{2 - \cos \theta}$$

[0378] 所述弯月面52延伸进入所述区室的距离h能够确定,并且能够结合极性介质的体积2的尺寸进行控制,以控制所述弯月面52的尺寸。在概念上,假定极性介质的完美球形体积2直径为d,当直径 $d \geq c - h$ 时界面将形成于所述弯月面52和极性介质的体积2之间。对于150 μm 的直径d,Permex是所述分隔件6的材料而所述层50的极性介质是1M HEPES,对于b和c的合适值是 $b = 150\mu\text{m}$, $a = 30\mu\text{m}$, $c < 170\mu\text{m}$ 。

[0379] 对于支柱阵列,弯月面52形成于所述分隔件6上,处于称为超疏水性或法基尔(Fakir)态。在满足以下条件时出现所述法基尔态:

$$[0380] \quad \cos \theta < (-1 + 4 \frac{c}{a} \phi_s)$$

[0381] 其中a是所述支柱的厚度并且其中 ϕ_s 为无量纲项,其等于固体与所述液体接触的份数。

[0382] 尽管上述实施例为了易于理解假定极性介质的完美球形体积2,情况可能不是这样的。在凝胶的情况下,极性介质的体积2可以经过设计而具有其它形状。此外,即使在进入所述区室4之前的形状是球形的,它会根据与所述支撑物3和/或所述电极13的表面相互作用的性质而发生一定程度的变形,从而在容纳于所述区室4中之后改变极性介质的体积2的高度。在评价极性介质的体积2的高度时也需要考虑这个因素,以便能够自发地形成膜。

[0383] 所述区室4的宽度和高度可以如下选择。考虑到横跨支撑物3的所述区室4的不同轮廓,为了此目的,区室4的宽度定义为所述区室4中能够容纳的最大假想球体的直径。

[0384] 所述区室4的宽度可以经过选择以具有小于2倍极性介质的所述体积的平均直径

的值,以避免在需要的情况下不只是一个极性介质的体积2可以以并排的关系包含于区室4的可能性。在极性介质的体积是液体小液滴的情况下,考虑到所述小液滴可能变形,从而降低了其平均宽度的事实,所述区室的宽度可以具有小于2倍,例如1.75倍所述宽度的值。

[0385] 对于极性介质的体积2是在所述非极性介质中的小液滴的情况,所述区室4的宽度可以进一步选择为大于极性介质的体积2的平均直径的值,使其可以自由地插入到所述区室4中。为了这个目的,所述宽度通常是极性介质的体积2的平均直径的至少1.05倍。所述宽度将通常是极性介质的体积2的平均直径的至多1.5倍。比这更大的宽度提供了极性介质的体积2可以在所述区室4中移动的可能性。在理想情况下极性介质的体积2以紧密包装布置方式提供于所述区室4中。

[0386] 所述区室4的高度是由所述分隔件6的高度决定的。所述区室4的高度根据极性介质的体积2的尺寸和用极性液体形成膜的能力进行选择。所述支柱高度通常介于所述小液滴区中所述小液滴高度的1.1~1.3x。所述区室4可以具有极性介质的所述体积的平均直径至少1.1倍的高度。所述区室4可以具有极性介质的所述体积的平均直径至多1.3倍的高度。在极性介质的体积是珠粒的具体实施方式中,它可以延伸超过所述分隔件的高度。

[0387] 现在将给出使用如上所述的装置1实施的实验的一些实施例。在各个实施例中,所述装置1作为阵列芯片形成。

[0388] 所述第一个实施例如下。

[0389] 在非极性介质中的极性介质小液滴可以如下制备。2mg/mL的6-30-6PMOXA-PDMS-PMOXA三嵌段共聚物溶于AR20硅油中以提供所述非极性介质。所述极性介质由在100mM HEPES中的625mM KCl, 75mM亚铁氰化钾和25mM铁氰化钾构成。在具有300 μ m宽度的两个相交通道的微流体T-连接(芯片类型:白云石(Dolomite),部件编号No.3000158)中制备小液滴。所述通道朝向所述交叉变窄以在所述交叉处提供105 μ m的通道宽度。所述极性和非极性溶液沿所述通道以3~4 μ L/min和15~17 μ L/min的相应溶液流速进行流动以提供具有150~160 μ m小液滴尺寸的小液滴。

[0390] 所述流速能够变化以提供不同尺寸的小液滴。

[0391] 具有200 μ m \times 225 μ m间隔开的Pt连接器阵列的硅晶片涂上2~3 μ m的SU光刻胶层。Permex支柱通过标准光刻方法添加到所述基座支撑物上,其中未交联的Permex前体涂施于所述基座,所述前体通过图案化的掩模通过暴露于UV光发生交联。所述未交联的前体随后冲洗掉以显示所述支柱结构。所得的阵列具有根据图2的支柱形状的38 \times 128小液滴区。所述支柱高度为160 μ m。直径145 μ m的小液滴如上所述以AR20油/小液滴乳液的形式添加到所述阵列中。

[0392] 所述乳液施加到所述阵列的顶部表面,油和小液滴通过毛细作用吸入到所述阵列中。过量的小液滴通过AR20硅油流过所述阵列而去除。所述小液滴通过表面张力保留于所述阵列中。

[0393] 所述阵列置于流动池中并将含有MspA蛋白纳米孔的极性介质流过所述阵列的表面以在小液滴界面上提供离子通道。

[0394] 含有单一MspA纳米孔的小液滴界面选出进行实验并通过测定DNA易位期间通过所述各个纳米孔的离子流进行DNA的测定。

[0395] 所述第二个实施例如下。

[0396] 根据以下的通用方法制备装置。

[0397] 所述阵列芯片在无尘室(clean-room)设施中制作。具有1 μ m热氧化物(SiMat)的6英寸Si晶片用作所述基座支撑物。所述晶片最初用200W, O₂等离子体在等离子体处理器(Oxford Instruments)中进行处理,其随后于150℃加热板(Electronic Micro Systems Ltd)上脱水焙烧15min。所述晶片在旋涂机(Electronic Micro Systems Ltd, 3000rpm, 30s)中涂布一层1 μ m SU-8 2光刻胶(MicroChem Corp.), 65℃软烘焙并在热板上95℃烘焙2min,在UV掩模对准器(Quintel Corp.)中充分曝光(flood expose) (110mJ/cm²),随后进行65℃下曝光后烘焙(PEB) 1min,接着95℃下在加热板上烘焙2min。然后将所述晶片旋涂(1250rpm, 30s) 120 μ m厚的SU-8 3050层,并65℃软烘焙5min,接着在水平热板上95℃下烘焙2.5h。冷却后,使用以所述微流体网络图案化的光掩模在所述掩膜对准器中曝光(260mJ/cm²)。随后进行PEB:在65℃下2min,以及在95℃下15min。通过在合适尺寸的烧杯中将所述晶片浸没于Microposit EC溶剂(Rhom Haas Electronic Materials)中,并且震荡10min,最后漂洗来显影所述通道特征。一旦形成所述通道,所述晶片用O₂等离子体在200W下处理1min以促进所述顶层和SU-8光刻胶粘附。

[0398] 所述通道使用Exclam-Plus层压机(GMP) (顶部辊设定于45℃,压力设定于1mm厚度,以及速度设置为50cm/min)用100 μ m厚度的薄膜层压光刻胶SUEX (DJ DevCorp)的层进行封密。然后层压后烘焙在65℃下进行3min。冷却后,将所述SUEX层使用所述流体端口掩模进行曝光(1400mJ/cm²)。应当指出的是,所述层压体上的保护性聚合物层保留其上。所述PEB为65℃下3min,随后95℃下7min,再次地所述保护膜在其上。然后所述晶片使用丙二醇单甲醚乙酸酯(Sigma-Aldrich)显影10min,并用异丙醇充分漂洗,确保所有残余显影剂从通道内部冲洗掉。所述晶片最后进行150℃硬烘烤1h,并切成单个芯片阵列。

[0399] 实施例1

[0400] 这个实施例描述了用于生产所述三嵌段共聚物小液滴的方法,所述三嵌段共聚物小液滴用于填充所述阵列上的互连小液滴区。

[0401] 材料和方法

[0402] 通过附连纳米端口装置(Upchurch Scientific)作为流体界面制备用于产生小液滴的所述T-连接(T-junction)芯片。

[0403] 所述在T-连接中产生小液滴的机理在文献[Garstecki et al., Lab Chip, 2006, 6, 437-446和Thorsen et al., Physical Review Letters, 2001, 86, 18, 4163-4166]中已有充分记载。考虑到所涉及的所述试剂的流体粘度,对于两种情况(油和缓冲剂)所选择的T-连接的几何形状都是50 μ m的通道宽度。

[0404] 1.1-小液滴试剂

[0405] 为了制成在油中水相小液滴,使用缓冲剂作为分散相,而硅油(例如,AR20)用作连续相。按照以下所述制备缓冲剂和含三嵌段共聚物的油。

[0406] 缓冲剂的溶液(缓冲液1)通过将298mg KCl (99.99%纯度, Sigma)加入至10mL脱气去离子水中而制备。向该溶液中加入30.35mg 2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇(99.9%, Sigma)。使用少量的HCl和NaOH将所述溶液缓冲至pH 8。向所述溶液中加入316.5mg K₂[Fe(CN)₆] (99.9%, Sigma)和82.3mg K₃[Fe(CN)₆] (99.9%, Sigma),并搅拌直至溶解。

[0407] 油-三嵌段共聚物溶液通过将20mg聚合物(6-33-6, PMOXA-PDMS-PMOXA,

PolymerSource) 加入至1mL AR20 (99%,Sigma) 中而制备。将所述聚合物继续搅拌于所述油中24h,直至所有的聚合物溶解。

[0408] 1.2-小液滴产生装置(setup)

[0409] 所述小液滴产生装置由以下组成:两个注射泵(Elite,Harvard Apparatus),两个气密注射器(Hamilton),峰管(peak tubing)(Upchurch Scientific)和定制的T-连接微流体芯片。一旦注射器载入油和缓冲剂并安装于所述注射器泵上,所述峰管就用于建立与所述芯片上的端口的流体连接。所述油注射器连接到所述连续相通道输入部,而所述缓冲剂连接到所述分散相通道输入部。

[0410] 两个注射器泵都经过设置以10 μ L/min的流速灌注,这就产生了129.46 μ m的平均小液滴尺寸(直径),标准偏差为10.87 μ m。所述小液滴然后收集于小瓶中。

[0411] 实施例2

[0412] 该实施例描述了使用在不同油中的许多不同的三嵌段共聚物产生小液滴-界面-双层(DIBs)的方法。还研究了形成双层和允许插入生物纳米孔(如MspA突变体)的能力。

[0413] 材料和方法

[0414] 实验2.1,2.3和2.4都是在以下三嵌段共聚物和油的组合上进行的。

[0415] 1-在AR20油(聚苯基-甲基硅氧烷,Sigma Aldrich)中的6-33-6(PMOXA-PDMS-PMOXA) PolymerSource (20mg/mL)。

[0416] 2-在PDMS-OH 65cSt油(聚(二甲基硅氧烷),羟基封端,Sigma Aldrich)中的6-33-6(PMOXA-PDMS-PMOXA) PolymerSource (20mg/mL)。

[0417] 3-在十六烷(99.9%,Sigma Aldrich)中的6-45PE-6(PMOXA-PE-PMOXA,其中PE=聚乙烯链,长度约45个碳原子) PolymerSource (20mg/mL)。

[0418] 4-在AR20油(聚苯基-甲基硅氧烷,Sigma Aldrich)中的6-32-6(PMOXA-PDMS-PMOXA) HighForce (20mg/mL)。

[0419] 2.1-小液滴稳定性实验

[0420] 通过制备在不同的油中的缓冲液和三嵌段ABA聚合物的溶液离线测定小液滴稳定性。0.5cm²小托盘采用聚碳酸酯和载玻片制备。所述托盘充满油。向所述油中加入1 μ L缓冲剂小液滴和进行24h监测。

[0421] 对仅表现出很小程度合并的小液滴进行电DIB测试。

[0422] 2.2-实验装置(set-up)

[0423] 所述实验系统如下。将700B膜片钳放大器(axopatch)相连于包含两个微操作器的屏蔽箱(shield box)内。整个法拉第笼(faraday cage)放置于倒置显微镜(Nikon)上从而可以从下方观察所述小液滴的操作。这容许所述小液滴在不打开所述法拉第笼下就能移动。

[0424] 在所述法拉第笼中,所述700B膜片钳放大器的电极通过纯金(Au)导线连接。

[0425] 通过火焰烧所述端部制备用于所述小液滴装置的所述Au,从而使所述导线形成小金珠粒。所述Au导线通过在浓HNO₃中浸没30s,并用DI水充分洗涤而进行清洗。所述球末端导线然后重复移动通过由缓冲剂(5wt%低熔融琼脂糖,龙沙(Lonza)/缓冲剂400mM KCl,75mM K₂[Fe(CN)₆](99.9%,Sigma)和25mM K₃[Fe(CN)₆](99.9%,Sigma),10mM Tris)制备的液体琼脂糖溶液。一旦小珠粒形成于所述端部上,则容许所述琼脂糖冷却,并将所述导线

存储于过量的缓冲剂溶液中以达到平衡。

[0426] 所述小液滴室安装于所述法拉第笼中的平台(stage)上,所述电极经过安装使二者都落入所述室的中央部分内。所述操纵器定位使得在所述室的区域内通过两个电极可以实现X和Y方向上的全方位移动。所述室随后用所述AR20三嵌段共聚合物溶液填充至边缘,并容许静置数分钟。1μL缓冲剂直接吸到每个所述琼脂糖尖端的Au导线上,两个电极直接在所述AR20/三嵌段共聚合物溶液下移动。在移动之前所述小液滴保持于所述溶液下30s。

[0427] 2.3-双层的形成

[0428] 为了用所述小液滴对形成膜,除了180mV偏置电压之外,对所述电极施加了±20mV的波形。所述电流响应作为电容膜形成的指示进行监测。将所述小液滴小心地汇聚一起使两个缓冲剂体积之间接触。所述小液滴保持在此状态下,直至形成膜。在所述膜生长非常缓慢的情况下,所述小液滴在XY方向上移动,这会迫使两个小液滴之间排除AR20/三嵌段共聚合物,并且有助于膜生长。

[0429] 2.4-纳米孔插入实验

[0430] 为了将跨膜孔插入穿过所述膜,向所述缓冲液(形成所述分析物)中加入0.0005mg/mL MspA-(B2C)(SEQ ID NO:1和9)的溶液。所述孔的插入通过瞬时电流的增加而进行观察。这在不存在所述波形,但在所施加的偏置电压之下进行。

[0431] 结果

[0432] 所研究的所述不同的三嵌段共聚合物和油的组合如下表1中所示。

[0433]	三嵌段共聚合物	油	离线稳定性测试	膜形成	MspA-(B2C)孔插入
	6-33-6 PolymerSource	AR20	形成稳定的小液滴	观察到电容膜生长	孔插入
	6-33-6 PolymerSource	PDMS-OH 65cSt	形成稳定的小液滴	观察到电容膜生长	孔插入
	6-45PE-6 PolymerSource	C16	形成稳定的小液滴	观察到电容膜生长	孔插入
	6-32-6 HighForce	AR20	形成稳定的小液滴	观察到电容膜生长	孔插入

[0434] 表1

[0435] 对于所测试的所有三嵌段共聚合物/油都观察到电容膜的生长和孔插入。对于与AR20硅油一起使用的6-33-6PolymerSource三嵌段共聚合物观察膜生长和MspA-(B2C)(SEQ ID NO:1和9)孔插入。对于与十六烷一起使用的6-45PE-6-PolymerSource(作为不具有所述PDMS中心核结构的三嵌段共聚物的实例)观察膜生长和孔插入。

[0436] 实施例3

[0437] 这个实施例描述了用于产生由图案化的互连小液滴区组装的阵列芯片的方法。

[0438] 材料和方法

[0439] 3.1-阵列芯片的形成

[0440] 3.1.1阵列芯片的制作

[0441] 所述阵列芯片在无尘室(clean-room)设施中制作。具有1 μ m热氧化物(SiMat)的6英寸Si晶片用作所述支撑物的基座。所述晶片最初用200W, O₂等离子体在等离子体处理器(Oxford Instruments)中进行处理,其随后于150℃加热板(Electronic Micro Systems Ltd)上脱水焙烧15min。所述晶片在旋涂机(Electronic Micro Systems Ltd, 3000rpm, 30s)中涂布一层1 μ m SU-82光刻胶(MicroChem Corp.), 65℃软烘焙并在热板上95℃烘焙2min,在UV掩模对准器(UV mask aligner)(Quintel Corp.)中充分曝光(flood exposed)(110mJ/cm²),并随后进行65℃下曝光后烘焙(PEB)1min,接着95℃下在加热板上烘焙2min。然后将所述晶片旋涂(1250rpm, 30s)120 μ m厚的SU-8 3050层,并65℃软烘焙5min,接着在水平热板(level hot plate)上95℃下烘焙2.5h。冷却后,使用以所述微流体网络图案化的光掩模在所述掩膜对准器中曝光(260mJ/cm²)。随后进行PEB:在65℃下2min以及在95℃下15min。通过在合适尺寸的烧杯中将所述晶片浸没于Microposit EC溶剂(Rhom Haas Electronic Materials)中,并震荡10min和最后漂洗来显影所述通道特征。一旦形成所述通道,所述晶片用O₂等离子体在200W下处理1min以促进所述顶层和SU-8光刻胶粘附。

[0442] 所述通道使用Exclam-Plus层压机(GMP),顶部辊设定于45℃,压力设定于1mm厚度以及速度设置为50cm/min,用100 μ m厚度的薄膜层压光刻胶SUEX(DJ DevCorp)的层进行密封。然后层压后烘焙在65℃下进行3min。冷却后,使用所述流体端口掩模将所述SUEX层曝光(1400mJ/cm²)。应当指出的是,所述层压体上的保护性聚合物层保留其上。所述PEB为65℃下3min,随后95℃下7min,所述保护膜仍在其上。然后所述晶片使用丙二醇单甲醚乙酸酯(Sigma-Aldrich)显影10min,并用异丙醇充分漂洗,确保所有残余显影剂从通道内部冲洗掉。所述晶片最后进行150℃硬烘烤1h,并切成单独芯片。

[0443] 3.1.2开放的结构阵列芯片制作

[0444] 功能性结构阵列芯片在无尘室设施中制作。含有偏置(偏压,bias)和电极的6英寸Si晶片(Silex)用作所述基底。所述晶片最初用200W, O₂等离子体在等离子体处理器(Oxford Instruments)中进行处理,其随后于150℃加热板(Electronic Micro Systems Ltd)上脱水焙烧15min。所述晶片在旋涂机(Electronic Micro Systems Ltd, 3000rpm, 30s)中涂布1 μ m SU-8 2光刻胶(MicroChem Corp.)层,65℃软烘烤并在热板上95℃烘焙2min,在具有种子层掩膜(Seed layer mask)的UV掩模对准器(Quintel Corp.)中曝光(110mJ/cm²)。所述晶片随后进行65℃下曝光后烘焙(PEB)1min,接着95℃下在热板上烘焙2min,并在EC溶剂中显影1min。所述种子层的功能是改善所述高纵横比的附着力并且这也确保了仅所需的电极区域暴露于溶液。

[0445] 干膜光刻胶TMMF 2030(Tokyo Ohka Kogyo Co.Ltd.)层使用Excelam-Plus辊层压机(GMP Co.Ltd.) (具有85℃顶辊温度)施加于所述晶片。这个过程随后重复五次,以达到150 μ m厚度。然后,所述晶片在掩膜对准器中(使用支柱结构掩模)暴露于UV。PEB在95℃下热板上进行10min之后显影在EC溶剂中的光刻胶12min。所述晶片然后用200W O₂等离子体处理并在200℃下在烘箱中硬烘焙1h。

[0446] 在此阶段具有所形成的支柱结构的晶片切成单个器件并包装到含ASIC的PCBs上。

[0447] 3.1.3封闭结构阵列芯片的制作

[0448] 这种类型的功能性结构在与所述开放结构阵列芯片制作,即含偏置和电极的Silex晶片相同的基座基底中制作。按照前面部分所述的相同方式形成种子层。然后将所述

晶片与四层TMMF 2030干膜光刻胶一起进行层压(采用与以上所述相同工艺参数)。这四个层(具有120 μ m的总厚度)随后用韦尔斯(Wells)掩模曝光。所述晶片随后与第五层TMMF 2030一起层压并使用所述支柱掩模曝光。所述晶片随后在95℃下进行10min PEB,在EC溶剂中显影12min,在200W下进行2min O₂等离子体处理,并在200℃下硬烘烤1h。

[0449] 在此阶段具有所形成的孔井和支柱结构的晶片切成单个器件并包装到含ASIC的PCB上。

[0450] 实施例4

[0451] 这个实施例描述了使用实施例1中详述的方法形成的三嵌段共聚物小液滴用于填充(populate)所述阵列芯片的方法,所述阵列芯片由图案化的互连小液滴区组装。

[0452] 材料和方法

[0453] 4.1-在开放的结构阵列上的膜形成

[0454] 为了将所述小液滴分散于所述互连小液滴区的阵列上,使用了1000 μ L移液枪(Gibson)。所述移液枪枪头切掉1mm以加大所述孔口并且防止由于剪切应力造成的小液滴合并。所述小液滴然后缓慢分配到所述互连小液滴区的表面上,确保整个区域都大量过量覆盖。大部分所述过量的小液滴溶液然后通过倾斜所述阵列而移除,以便允许重力除去还未捕获于所述小液滴区中的所述过量的小液滴。在这一点上,将足够大以适配所述阵列整个区域的流动池置于其顶部,密封,并随后填充油。这个步骤能够实施,是因为小液滴能够相互粘结并且用油冲洗流动池去除了所述捕获阵列顶部的剩余小液滴。最后,通过冲洗掉所述油本体,并且用水相即缓冲液1替换在每一单独小液滴和公共含水体积之间形成三嵌段共聚物膜。由于所述油从所述流动池被置换掉,所述水溶液得以与所述捕获结构的顶部部分以及每个小液滴的顶部接触。所述自组装三嵌段共聚物层阻止了所述两个水相的合并;条件是所述小液滴足够大以与所述本体水溶液接触。所述装置1的横截面如图31中所示。

[0455] 实施例5

[0456] 这个实施例描述了MspA-(B2C)(SEQ ID NO:1和9)孔插入三嵌段共聚物小液滴(在AR20(Sigma Aldrich)中的AR206-33-6PolymerSource小液滴和解旋酶控制的DNA移动穿过所述纳米孔。在这些实验中所用的小液滴由已经在AR20硅油中的三嵌段共聚物中涂覆的交联琼脂糖珠粒(Bio-Works)(140-150 μ m)制成。

[0457] 材料和方法

[0458] 5.1-琼脂糖珠粒的制备

[0459] 所述交联琼脂糖珠粒获自Bio-Works,具有宽的尺寸范围(130~250 μ m)。所述小液滴随后使用过滤器过筛以获得尺寸范围140~150 μ m的珠粒并存储于纯水中。然后,所述珠粒进行至少5次离心和缓冲液交换(625mM KCl,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾,100mM CAPS,pH 10.0)。在最后的缓冲液交换和离心步骤(用于除去过量水)之后立即将所述珠粒提取出来并且浸没于10mg/mL在AR20硅油中的6-33-6PolymerSource三嵌段共聚物中。所述珠粒在所述油中短暂地涡旋30s,并静置1h。

[0460] 5.2-膜形成

[0461] 将6-33-6PolymerSource三嵌段共聚物/AR20中的交联琼脂糖珠粒加入到所述阵列中,并手动插入所述互连小液滴区域中。填充之后立即将少量的10mg/mL 6-33-

6PolymerSource三嵌段共聚物/AR20 (~50 μ L) 加入到所述阵列的表面上以浸没所述珠粒并将其保持于油下。在此状态下将其温育5min。在此之后, 组装所述芯片并立即将缓冲液(625mM KCl, 75mM亚铁氰化钾, 25mM铁氰化钾, 100mM CAPS, pH 10.0) 流过。所述阵列随后准备进行测试。

[0462] 5.3-孔插入和解旋酶控制的DNA移动

[0463] 为了使孔插入到所述三嵌段共聚物中, 将具有MspA- (B2C) (SEQ ID NO:1和9) 的缓冲液(625mM KCl, 75mM亚铁氰化钾, 25mM铁氰化钾, 100mM CAPS, pH 10.0) 的溶液流过所述阵列。施加+180mV的保持电位并容许孔进入双层直到达到至少10%的占有率。一旦孔插入, 则随后让所述不包含MspA- (B2C) (SEQ ID NO:1和9) 的缓冲剂溶液(625mM KCl, 75mM亚铁氰化钾, 25mM铁氰化钾, 100mM CAPS, pH 10.0) 流过所述阵列, 以防止其它孔插入至所述三嵌段共聚物中。为了观察解旋酶控制的DNA移动, 使包含在缓冲液(625mM KCl, 75mM亚铁氰化钾, 25mM铁氰化钾, 100mM CAPS, pH 10.0) 中的DNA(通过4个间隔子基团SEQ ID NO:3连接至SEQ ID NO:4, 1nM), 解旋酶(100nM), dTTP(5mM), Mg^{2+} (10mM) 的溶液流过所述阵列。施加+180mV的保持电位并观察解旋酶控制的DNA移动。

[0464] 结果

[0465] 一旦将所述三嵌段共聚物覆盖的琼脂糖小液滴暴露于MspA- (B2C) 纳米孔, 观察到所述孔插入到所述三嵌段共聚物中。一旦向所述体系中加入DNA(通过4个间隔子基团SEQ ID NO:3连接至SEQ ID NO:4, 1nM) 和解旋酶, 观察到解旋酶控制的DNA易位通过MspA- (B2C) 纳米孔。两个实施例电流迹线(显示解旋酶控制的DNA移动通过插入到琼脂糖小液滴中的纳米孔) 如图48a和图48b所示。

[0466] 实施例6

[0467] 这个实施例描述了 α -溶血素- (E111N/K147N)₇ (SEQ ID NO:5和6) 孔插入到所述三嵌段共聚物小液滴中(在AR20 (Sigma Aldrich) 中6-33-6PolymerSource小液滴以及这个体系如何用于检测所述蛋白凝血酶的存在。在这些实验中使用的所述小液滴由低熔琼脂糖制成。

[0468] 材料和方法

[0469] 6.1-琼脂糖珠粒的制备

[0470] 所述小液滴产生装置由以下组成: 两个注射泵 (Elite, Harvard Apparatus), 两个气密注射器 (Hamilton), 峰管 (peaking tubing) (Upchurch Scientific) 和定制的T-连接微流体芯片。一旦注射器一个载入在AR20油中的6-33-6三嵌段共聚物, 且另一个载入2%的在缓冲液(625mM KCl, 75mM亚铁氰化钾, 25mM铁氰化钾, 100mM CAPS, pH 10.0) 中的低熔琼脂糖(龙沙, Lonza) 并安装于所述注射泵上, 所述峰管用于建立与所述芯片上的端口的流体连接。所述油注射器连接到所述连续相通道输入部, 而所述缓冲液连接到所述分散相通道输入部。为了制作琼脂糖小液滴, 所述装置置于50 $^{\circ}$ C烘箱中, 使所述琼脂糖溶液在所述小液滴产生过程期间保持流体态。

[0471] 两个注射泵设置为对于缓冲液中的所述琼脂糖以10 μ L/min的流速灌注, 对于AR20油中的所述6-33-6以25 μ L/min灌注, 这会产生平均小液滴尺寸(直径) 150 μ m, 标准偏差为5 μ m。所述小液滴然后收集于小瓶中。

[0472] 6.2-膜的形成

[0473] 所述三嵌段共聚物膜按照实施例5中的描述形成。

[0474] 6.3-孔插入和所述蛋白凝血酶的检测

[0475] 为了使孔插入所述三嵌段共聚物中,具有 α -溶血素-(E111N/K147N)₇(SEQ ID NO:5和6)的缓冲剂(625mM KCl,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾,100mM CAPS,pH 10.0)的溶液流过所述阵列。施加+180mV的保持电位并容许孔进入双层直到达到至少10%的占有率。一旦孔插入,则随后让不含 α -溶血素-(E111N/K147N)₇(SEQ ID NO:5和6)的缓冲溶液(625mM KCl,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾,100mM CAPS,pH10.0)流过所述阵列,以防止其它孔插入至所述三嵌段共聚物中。为了观察凝血酶结合适体,将包含在缓冲液(625mM KCl,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾,100mM CAPS,pH 10.0)中的所述适体(SEQ ID NO:7,1 μ M)和凝血酶(1 μ M)的溶液流过所述阵列。施加+180mV的保持电位并检测对应于凝血酶存在和不存在的特征钳位信号电平(block level)。

[0476] 结果

[0477] 一旦所述三嵌段共聚物覆盖的琼脂糖小液滴暴露于 α -溶血素-(E111N/K147N)₇(SEQ ID NO:5和6)纳米孔,则观察所述孔插入所述三嵌段共聚物。一旦向所述体系中加入凝血酶和适体(SEQ ID NO:7),则观察对应于凝血酶存在或不存在的特征钳位信号电平。获得的电流迹线表明在不存在结合的凝血酶下(1)和存在凝血酶下(2)产生的所述钳位(block),如图49中所示,这是显示对应于所述存在(钳位,标记2)和不存在(钳位,标记1)的特征钳位信号电平的电流迹线(current trace)(这是低通过滤的)。

[0478] 实施例7

[0479] 该实施例描述了如何使用光学测定确定MspA-(B2C)(SEQ ID NO:1和9)孔是否已经插入到三嵌段共聚物小液滴中。

[0480] 材料和方法

[0481] 7.1-小液滴的形成

[0482] 采用在单独的1mL汉密尔顿(Hamilton)注射器中在AR20油中的ExoI/DNA缓冲液1(962.5 μ M KCl,7.5mM亚铁氰化钾,2.5mM铁氰化钾,100mM CAPS(pH 10),50 μ M EDTA,50nM Eco ExoI,5 μ M FAM/BHQ1-标记的聚T 30链节(SEQ ID NO:8))和三嵌段共聚物(6-30-6),通过以16 μ L/min(缓冲液1)和以4 μ L/min(在油中的三嵌段聚合物)分别流过白云石(Dolomite)T型件来制备小液滴。

[0483] 7.2-阵列填充(population)和孔插入

[0484] 7.2-阵列充满和孔道插入

[0485] 使用200 μ L切掉末端的移液枪枪头,将200 μ L小液滴移液至4个清洁阵列上。过量的小液滴用2mg/mL在油中的三嵌段6-30-6洗掉。随后将500 μ L缓冲液2(962.5 μ M KCl,7.5mM亚铁氰化钾,2.5mM铁氰化钾,100mM CAPS(pH 10),50 μ M EDTA)流过所述四个阵列的每一阵列以覆盖所述小液滴。使用所述荧光显微镜获得每个阵列的明视野(brightfield)图像。

[0486] 缓冲液3和4然后如下表2中所示制备。缓冲液3(其含有MspA-(B2C)的纳米孔)(500 μ L)流过两个阵列而缓冲液4(不含有纳米孔,作为对照)流过另两个阵列。缓冲液3和4保留于所述阵列上30min之后,将含Mg²⁺的缓冲液(缓冲液5-0.5M MgCl₂,100mM CAPS,pH 10,7.5mM亚铁氰化钾,2.5mM铁氰化钾)流过所有四个阵列。所述阵列然后室温放置过夜之后使用5 \times 镜头获取每个阵列的明视野和FITC(2s曝光)图像。

[0487]		缓冲液3	缓冲液4
	MspA- (B2C)	7.5μL	
	储存缓冲液	-	7.5μL
	缓冲液2	1492.5μL	1492.5μL

[0488] 储存缓冲液=50mM Tris HCl,pH 9.0,100mM NaCl,0.1%DDM

[0489] 表2

[0490] 结果

[0491] 这个实施例描述了如何使用光学测量确定MspA- (B2C) (SEQ ID NO:1和9) 孔是否已插入到三嵌段共聚物小液滴中。MspA- (B2C) (SEQ ID NO:1和9) 孔允许插入三嵌段共聚物的小液滴中,其含有ExoI酶和荧光团/猝灭剂标记的DNA底物(SEQ ID NO:8)。通过随后将含 Mg^{2+} 的缓冲液流过所述小液滴的顶部, Mg^{2+} 阳离子通过插入的纳米孔流入所述小液滴,活化所述ExoI,允许其消化所述荧光团/猝灭剂DNA,导致荧光增加。用含MspA- (B2C) (SEQ ID NO:1和9) 的缓冲液(缓冲液3)处理过的阵列在所述阵列上显示出亮点,这表明孔已插入所述小液滴中,如图50所示。图51显示了对照实验,其中使用了不含MspA- (B2C) (SEQ ID NO:1和9) 的缓冲液(缓冲液4)。不存在亮点表明在对照条件(不存在MspA- (B2C) 纳米孔)下 Mg^{2+} 不能穿透所述三嵌段共聚物,因此,防止了所述酶活化和荧光增加。通过比较图50和图51,可以清楚的是,暴露于含纳米孔的缓冲液的小液滴显示出亮点,这对应于纳米孔插入所述三嵌段共聚物中。

[0492] 实施例8

[0493] 这个实施例描述了用于填充(populate)所述阵列的方法,所述阵列采用图案化互连小液滴区域组装。

[0494] 材料和方法

[0495] 8.2在半封闭结构阵列上的膜形成

[0496] 使用微量移液枪,将50μL的150μM AR20/1mL己烷混合物在100℃的温度下分配到干阵列的表面上,放置1h以允许所述油通过毛细作用分布通过所述阵列表面,对于己烷则蒸发掉。所述阵列安装于阵列支架(array holder)上,在其上放置1.5mm厚的垫圈,以这样的方式对齐,即所述阵列是完全开放的并且被包围。所述预想填充于每个单独孔井的缓冲液随后分散于所述阵列(700μL)的顶部;所述垫圈应该包含所述缓冲液体积。所述阵列随后置于真空室中,并抽空至25m bar长达1min,使缓冲液的体积提供于所述孔井内。然后将其从所述真空室移出并放置于流动池装置夹具上,其中流动池对准所述支架并夹紧以密封所述装置。AR20流前沿(flow-front) (700μL)然后用移液器缓慢推进通过所述流动池;在此步骤中容纳于所述孔井中的各水性体积与所述本体分离,并封装于油中。此步骤之后是5mL空气流前沿,其将所述过量油置换出所述流动池。所述流动池随后松开夹具以及拆解,允许30μL具有浓度10mg/mL的三嵌段共聚物(TBCP)的油分散于所述阵列的顶部并放置温育20min。在所述温育步骤后,通过将所述阵列置于90°下并容许其流出所述阵列将所述过量的油除去,因此其可以用纸巾(tissue)干燥。在这个阶段,所述含水体积准备形成TBCP膜。

[0497] 一旦所述孔井填充了含水物且TBCP已经引入所述体系中,则所述阵列组装到检测流动池中,其中随后引入缓冲液。随着缓冲液流前沿行进过所述阵列,它会取代任何留下的过量油,以允许所述本体缓冲液体积形成TBCP膜。

[0498] 实施例9

[0499] 这个实施例描述了根据图21和图22中所示以及图32a至图32i中示意性所示用于以极性和非极性介质的体积填充 (populate) 阵列的方法。

[0500] 油预处理

[0501] 阵列采用少量AR20硅油进行油预处理以填充所述孔井的微图案并将所述支柱和表面覆盖在薄油膜中。Harvard注射泵的1mL注射筒灌注AR-20油,分配速度设置为2 μ L/s。将1.7 μ L AR20硅油分配到尺寸6.04mm \times 14.47mm,具有以200 μ m间距间隔的2048个区室,孔井高度90 μ m以及支柱高度30 μ m的六边形紧密包装阵列的中心上,并允许铺展通过所述阵列。所述阵列然后经受100 $^{\circ}$ C烘箱中30min并随后取出并使其冷却。使用之前所述阵列经过检查,确保所述油已经达到了所述阵列的边缘。

[0502] 缓冲液填充

[0503] 10mL缓冲液(600mM KCl,100mM Hepes,75mM亚铁氰化钾(II),25mM铁氰化钾(III),pH 8)经过脱气,载入到流动池储液器(flow-cell reservoir)中。所述阵列如图27中所示置于所述流动池中并将所述阵列在真空(约35mBar)下填充缓冲液以在所述区室中提供缓冲液的体积。

[0504] 油填充

[0505] 紧跟所述缓冲液填充步骤之后,将5 μ L的10mg/mL TBCP/AR-20加入到流动池中并真空下流过所述阵列的顶部。将其放置以温育约5min以确保所述TBCP覆盖了所述整个阵列。过量的缓冲液从所述非阵列区域移除,过量的油在真空下从阵列除去。

[0506] 缓冲液层的加入

[0507] 在所述油填充步骤之后,将另外量的缓冲液流过所述阵列以提供缓冲液层/TBCP/缓冲液界面的体积。缓冲液的所述层也最小化水从所述区室中的缓冲液的所述体积中蒸发。

[0508] 实施例10

[0509] 这个实施例描述了用于填充 (populate) 实施例8中所述阵列的方法如何进行修改以产生显示所述互连小液滴区均匀填充和膜形成的共焦显微镜图像。所述图像表明,所述含水体积销钉于所述孔井的壁上,导致膜尺寸得以控制。

[0510] 材料和方法

[0511] 以上描述的所述各种图像通过共焦成像而采集。为了使实验中所涉及的材料在共焦显微镜中可辨别,将荧光染料稀释于所述试剂中。所述油 (AR20) 染上BODIPY 493/503 (绿色) 而所述缓冲溶液 (其形成所述离散的体积) 染上碘基罗丹明B (红色)。其余的材料并不染色,因此在共焦成像中作为暗区域出现。在膜形成实验 (图39a至图39b和图40a至图40c中所示) 中所述温育油 (具有10mg/mL TBCP) 也用BODIPY (493/503) 染色。在所述第一含水体积已经销钉 (pin) 于所述内孔井 (inner well) 的壁上之后流过所述阵列的所述本体缓冲液并未染色。所述共焦显微镜样品采用以上试剂使用前面部分 (实施例8) 中所述的方法进行制备,随后使用Nikon A1共焦显微镜进行成像。

[0001]	序列表															
[0002]	<110> 牛津楠路珀尔科技有限公司															
[0003]	<120> 用于形成含极性介质的体积的阵列的装置															
[0004]	<130> N117579B-W0															
[0005]	<140> tba															
[0006]	<141> 2013-10-23															
[0007]	<150> GB1313121.4															
[0008]	<151> 2013-07-23															
[0009]	<150> US61/718,899															
[0010]	<151> 2012-10-26															
[0011]	<160> 10															
[0012]	<170> PatentIn version 3.5															
[0013]	<210> 1															
[0014]	<211> 185															
[0015]	<212> PRT															
[0016]	<213> 人工序列															
[0017]	<220>															
[0018]	<223> MspA-B2C															
[0019]	<400> 1															
[0020]	Met	Gly	Leu	Asp	Asn	Glu	Leu	Ser	Leu	Val	Asp	Gly	Gln	Asp	Arg	Thr
[0021]	1				5					10					15	
[0022]	Leu	Thr	Val	Gln	Gln	Trp	Asp	Thr	Phe	Leu	Asn	Gly	Val	Phe	Pro	Leu
[0023]					20					25					30	
[0024]	Asp	Arg	Asn	Arg	Leu	Thr	Arg	Glu	Trp	Phe	His	Ser	Gly	Arg	Ala	Lys
[0025]					35					40					45	
[0026]	Tyr	Ile	Val	Ala	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Glu	Phe	Glu	Gly	Thr	Leu	Glu
[0027]					50					55					60	
[0028]	Leu	Gly	Tyr	Gln	Ile	Gly	Phe	Pro	Trp	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Ile	Asn
[0029]	65					70					75					80
[0030]	Phe	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Asn	Ile	Asn	Ile	Asn	Asn	Gly	Asn	Ile	Thr
[0031]						85					90					95
[0032]	Ala	Pro	Pro	Phe	Gly	Leu	Asn	Ser	Val	Ile	Thr	Pro	Asn	Leu	Phe	Pro
[0033]						100					105					110
[0034]	Gly	Val	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg	Leu	Gly	Asn	Gly	Pro	Gly	Ile	Arg	Glu
[0035]						115					120					125
[0036]	Val	Ala	Thr	Phe	Ser	Val	Arg	Val	Ser	Gly	Ala	Lys	Gly	Gly	Val	Ala
[0037]						130					135					140
[0038]	Val	Ser	Asn	Ala	His	Gly	Thr	Val	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Leu

[0039]	145	150	155	160
[0040]	Leu Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr			
[0041]		165	170	175
[0042]	Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn			
[0043]		180	185	
[0044]	<210> 2			
[0045]	<211> 184			
[0046]	<212> PRT			
[0047]	<213> 人工序列			
[0048]	<220>			
[0049]	<223> MS-B1 突变体			
[0050]	<400> 2			
[0051]	Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu			
[0052]	1	5	10	15
[0053]	Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp			
[0054]		20	25	30
[0055]	Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr			
[0056]		35	40	45
[0057]	Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu			
[0058]		50	55	60
[0059]	Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe			
[0060]	65	70	75	80
[0061]	Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asn Asn Gly Asn Ile Thr Ala			
[0062]		85	90	95
[0063]	Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly			
[0064]		100	105	110
[0065]	Val Ser Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val			
[0066]		115	120	125
[0067]	Ala Thr Phe Ser Val Arg Val Ser Gly Ala Lys Gly Gly Val Ala Val			
[0068]		130	135	140
[0069]	Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu			
[0070]	145	150	155	160
[0071]	Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr			
[0072]		165	170	175
[0073]	Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn			
[0074]		180		
[0075]	<210> 3			
[0076]	<211> 77			
[0077]	<212> DNA			

[0078]	<213> 人工序列
[0079]	<220>
[0080]	<223> 实施例5中使用的多核苷酸序列
[0081]	<400> 3
[0082]	tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ggttggttct 60
[0083]	gttggtgctg atattgc 77
[0084]	<210> 4
[0085]	<211> 530
[0086]	<212> DNA
[0087]	<213> 人工序列
[0088]	<220>
[0089]	<223> 实施例5中使用的多核苷酸序列
[0090]	<400> 4
[0091]	gacgctcagt aatgtgacga tagctgaaaa ctgtacgata aacggtacgc tgagggcgga 60
[0092]	aaaaatcgtc ggggacattg taaaggcggc gagecgcgct tttccgcgcc agcgtgaaag 120
[0093]	cagtgtggac tggccgtcag gtacccgtac tgtcaccgtg accgatgacc atccttttga 180
[0094]	tcgccagata gtggtgcttc cgctgacgtt tcgcggaagt aagcgtactg tcagcggcag 240
[0095]	gacaacgtat tcgatgtgtt atctgaaagt actgatgaac ggtgcggtga tttatgatgg 300
[0096]	cgcggcgaac gaggcggtac aggtgttctc ccgtattgtt gacatgccag cgggtcgggg 360
[0097]	aaacgtgatc ctgacgttca cgcttacgtc cacacggcat tcggcagata ttccgccgta 420
[0098]	tacgtttgcc agcgatgtgc aggttatggt gattaagaaa caggcgctgg gcatcagcgt 480
[0099]	ggtctgagtg tgaaaaaaaa aacccccaaa aaaaaacccc aaaaaaaaaa 530
[0100]	<210> 5
[0101]	<211> 885
[0102]	<212> DNA
[0103]	<213> 人工序列
[0104]	<220>
[0105]	<223> 编码 α -溶血素-E111N/K147N的一个亚基的多核苷酸
[0106]	<400> 5
[0107]	atggcagatt ctgatattaa tattaaaacc ggtactacag atattggaag caatactaca 60
[0108]	gtaaaaacag gtgatttagt cacttatgat aaagaaaatg gcatgcacaa aaaagtat 120
[0109]	tatagtttta tcgatgataa aaatcacaat aaaaaactgc tagttattag aacaaaaggt 180
[0110]	accattgctg gtcaatatag agtttatagc gaagaagggt ctaacaaaag tggttttagcc 240
[0111]	tggccttcag cctttaaggt acagttgcaa ctacctgata atgaagtagc tcaaatatct 300
[0112]	gattactatc caagaaattc gattgataca aaaaactata tgagtacttt aacttatgga 360
[0113]	ttcaacggta atgttactgg tgatgataca ggaaaaattg gcggccttat tgggtgcaaat 420
[0114]	gtttcgattg gtcatacact gaactatgtt caacctgatt tcaaaacaat tttagagagc 480
[0115]	ccaactgata aaaaagtagg ctggaaagtg atatttaaca atatggtgaa tcaaaattgg 540
[0116]	ggaccatacg atcgagattc ttggaaccgc gtatatggca atcaactttt catgaaaact 600

[0117] agaaatggtt ctatgaaagc agcagataac ttccttgatc ctaacaaagc aagttctcta 660
 [0118] ttatcttcag ggttttcacc agacttcgct acagttatta ctatggatag aaaagcatcc 720
 [0119] aaacaacaaa caaatataga tgtaatatat gaacgagttc gtgatgatta ccaattgcat 780
 [0120] tggacttcaa caaattggaa aggtaccaat actaaagata aatggacaga tcgtttctca 840
 [0121] gaaagatata aaatcgattg ggaaaaagaa gaaatgacaa attaa 885
 [0122] <210> 6
 [0123] <211> 293
 [0124] <212> PRT
 [0125] <213> 人工序列
 [0126] <220>
 [0127] <223> α-溶血素-E111N/K147N的一个亚基的氨基酸序列
 [0128] <400> 6
 [0129] Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
 [0130] 1 5 10 15
 [0131] Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn
 [0132] 20 25 30
 [0133] Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His
 [0134] 35 40 45
 [0135] Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln
 [0136] 50 55 60
 [0137] Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp
 [0138] 65 70 75 80
 [0139] Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala
 [0140] 85 90 95
 [0141] Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Asn Tyr
 [0142] 100 105 110
 [0143] Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp
 [0144] 115 120 125
 [0145] Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His
 [0146] 130 135 140
 [0147] Thr Leu Asn Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro
 [0148] 145 150 155 160
 [0149] Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn
 [0150] 165 170 175
 [0151] Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly
 [0152] 180 185 190
 [0153] Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp
 [0154] 195 200 205
 [0155] Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe

[0156]	210	215	220
[0157]	Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys		
[0158]	225	230	235 240
[0159]	Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr		
[0160]	245	250	255
[0161]	Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp		
[0162]	260	265	270
[0163]	Lys Trp Thr Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys		
[0164]	275	280	285
[0165]	Glu Glu Met Thr Asn		
[0166]	290		
[0167]	<210> 7		
[0168]	<400> 7		
[0169]	000		
[0170]	<210> 8		
[0171]	<211> 30		
[0172]	<212> DNA		
[0173]	<213> 人工序列		
[0174]	<220>		
[0175]	<223> 标记的多核苷酸链		
[0176]	<220>		
[0177]	<221> MISC_FEATURE		
[0178]	<222> (1) .. (1)		
[0179]	<223> BHQ1 标记		
[0180]	<220>		
[0181]	<221> MISC_FEATURE		
[0182]	<222> (15) .. (15)		
[0183]	<223> FAM 标记		
[0184]	<400> 8		
[0185]	ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30		
[0186]	<210> 9		
[0187]	<211> 555		
[0188]	<212> DNA		
[0189]	<213> 人工序列		
[0190]	<220>		
[0191]	<223> 编码MspA- (B2C) 突变体MspA单体的多核苷酸序列		
[0192]	<400> 9		
[0193]	atgggtctgg ataatgaact gagcctggtg gacggtcaag atcgtaccct gacggtgcaa 60		
[0194]	caatgggata cctttctgaa tggcgttttt ccgctggatc gtaatgcct gacccgtgaa 120		

[0195]	tggtttcatt ccggtcgcgc aaaatatatc gtcgcaggcc cgggtgctga cgaattcgaa	180
[0196]	ggcacgctgg aactgggtta tcagattggc tttccgtggt cactgagcgt tagtatcaac	240
[0197]	ttctcgtaca ccacgccgaa tattaacatc aacaatggta acattaccgc accgccgttt	300
[0198]	ggcctgaaca gcgtgattac gccgaacctg tttccgggtg ttagcatctc tgcccgtctg	360
[0199]	ggcaatggtc cgggcattcg cgaagtggca acctttagtg tgcgcgtttc cggcgctaaa	420
[0200]	ggcgggtgtcg cgggtgtctaa cgcccacggt accgttacgg gcgcggccgg cgggtgtcctg	480
[0201]	ctgcgtccgt tcgcgcgcct gattgcctct accggcgaca gcgttacgac ctatggcgaa	540
[0202]	ccgtggaata tgaac	555
[0203]	<210>	10
[0204]	<211>	558
[0205]	<212>	DNA
[0206]	<213>	人工序列
[0207]	<220>	
[0208]	<223>	编码MspA单体的MS-B1突变体的多核苷酸序列
[0209]	<400>	10
[0210]	atgggtctgg ataatgaact gagcctgggtg gacggtcaag atcgtaccct gacggtgcaa	60
[0211]	caatgggata cctttctgaa tggcgttttt ccgctggatc gtaatgcct gaccctgaa	120
[0212]	tggtttcatt ccggtcgcgc aaaatatatc gtcgcaggcc cgggtgctga cgaattcgaa	180
[0213]	ggcacgctgg aactgggtta tcagattggc tttccgtggt cactgggcgt tggtatcaac	240
[0214]	ttctcgtaca ccacgccgaa tattctgac aacaatggta acattaccgc accgccgttt	300
[0215]	ggcctgaaca gcgtgattac gccgaacctg tttccgggtg ttagcatctc tgcccgtctg	360
[0216]	ggcaatggtc cgggcattca agaagtggca acctttagtg tgcgcgtttc cggcgctaaa	420
[0217]	ggcgggtgtcg cgggtgtctaa cgcccacggt accgttacgg gcgcggccgg cgggtgtcctg	480
[0218]	ctgcgtccgt tcgcgcgcct gattgcctct accggcgaca gcgttacgac ctatggcgaa	540
[0219]	ccgtggaata tgaactaa	558

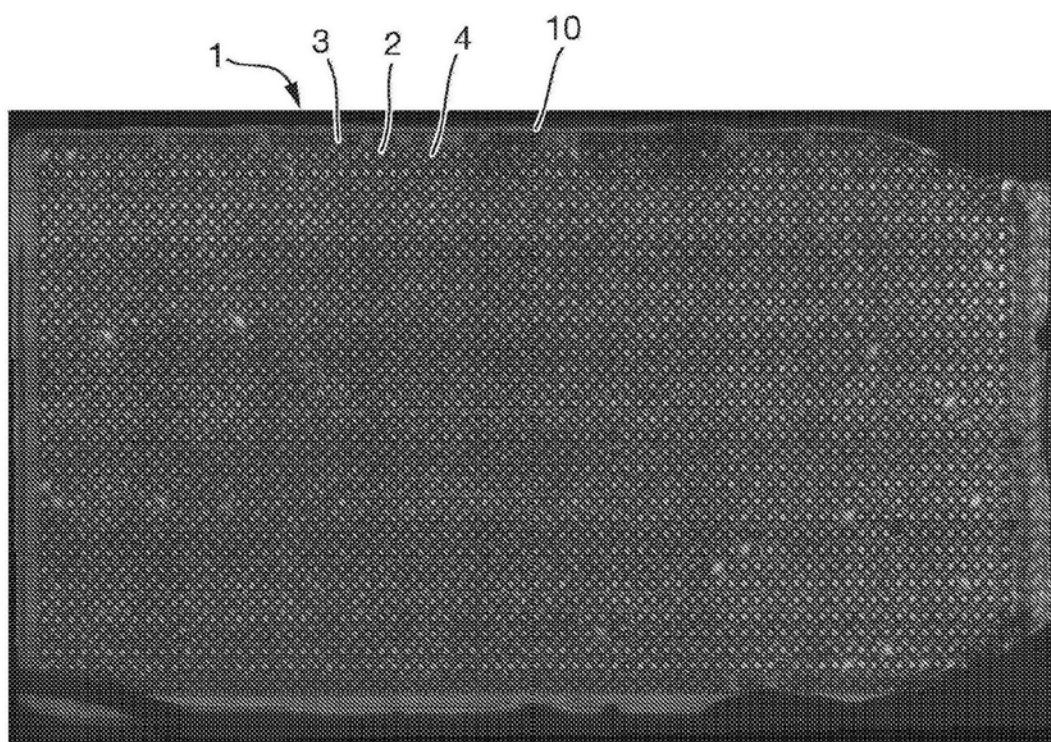


图1

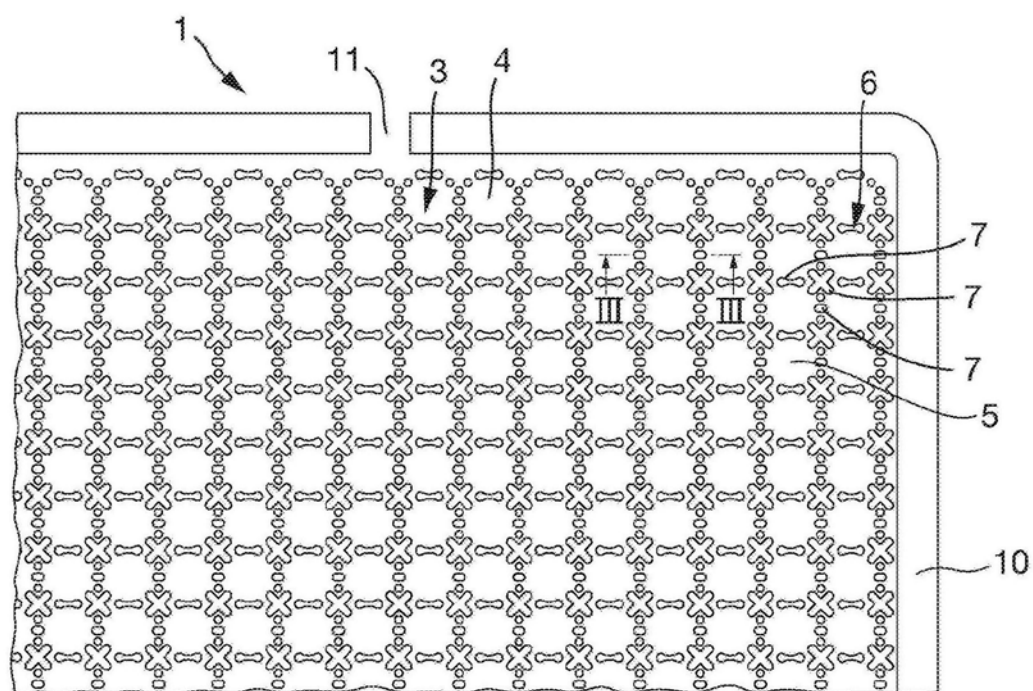


图2

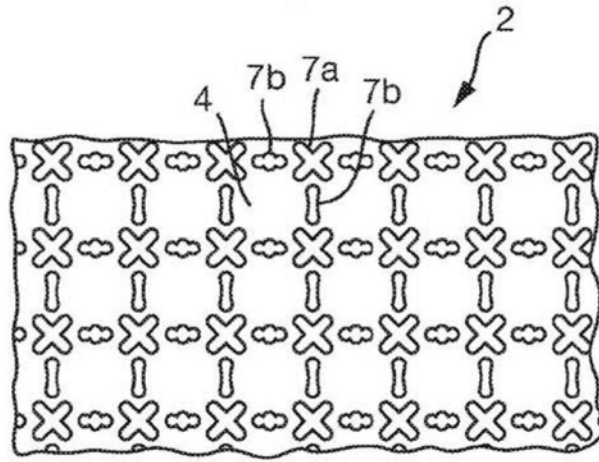


图5

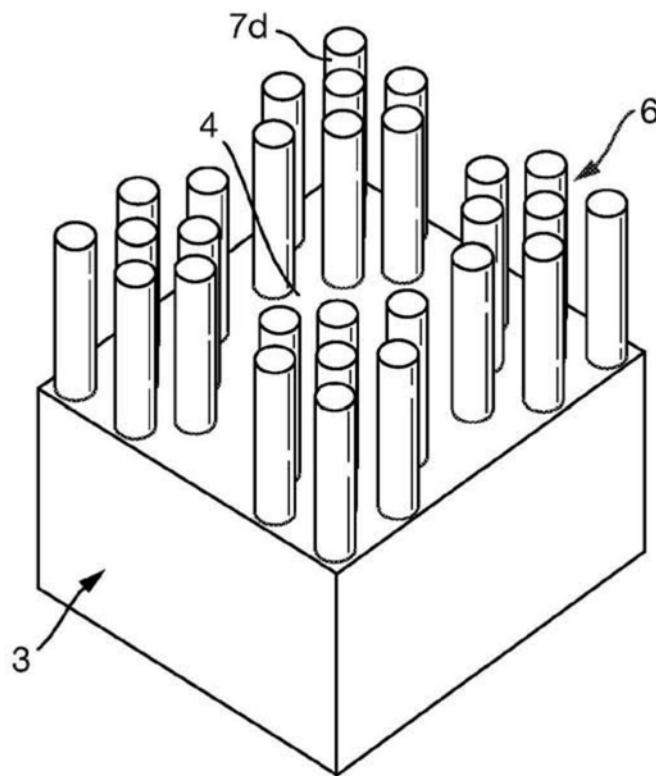


图6

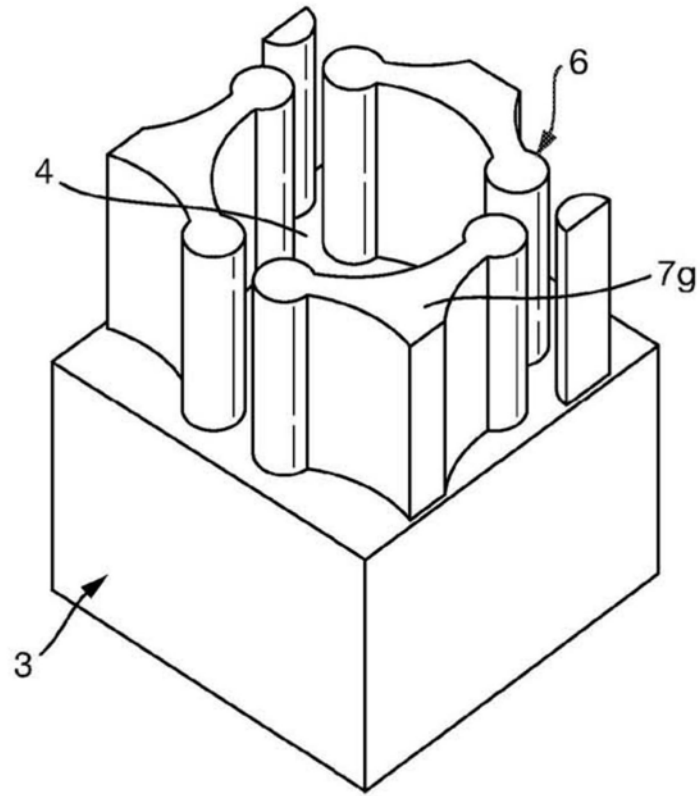


图7

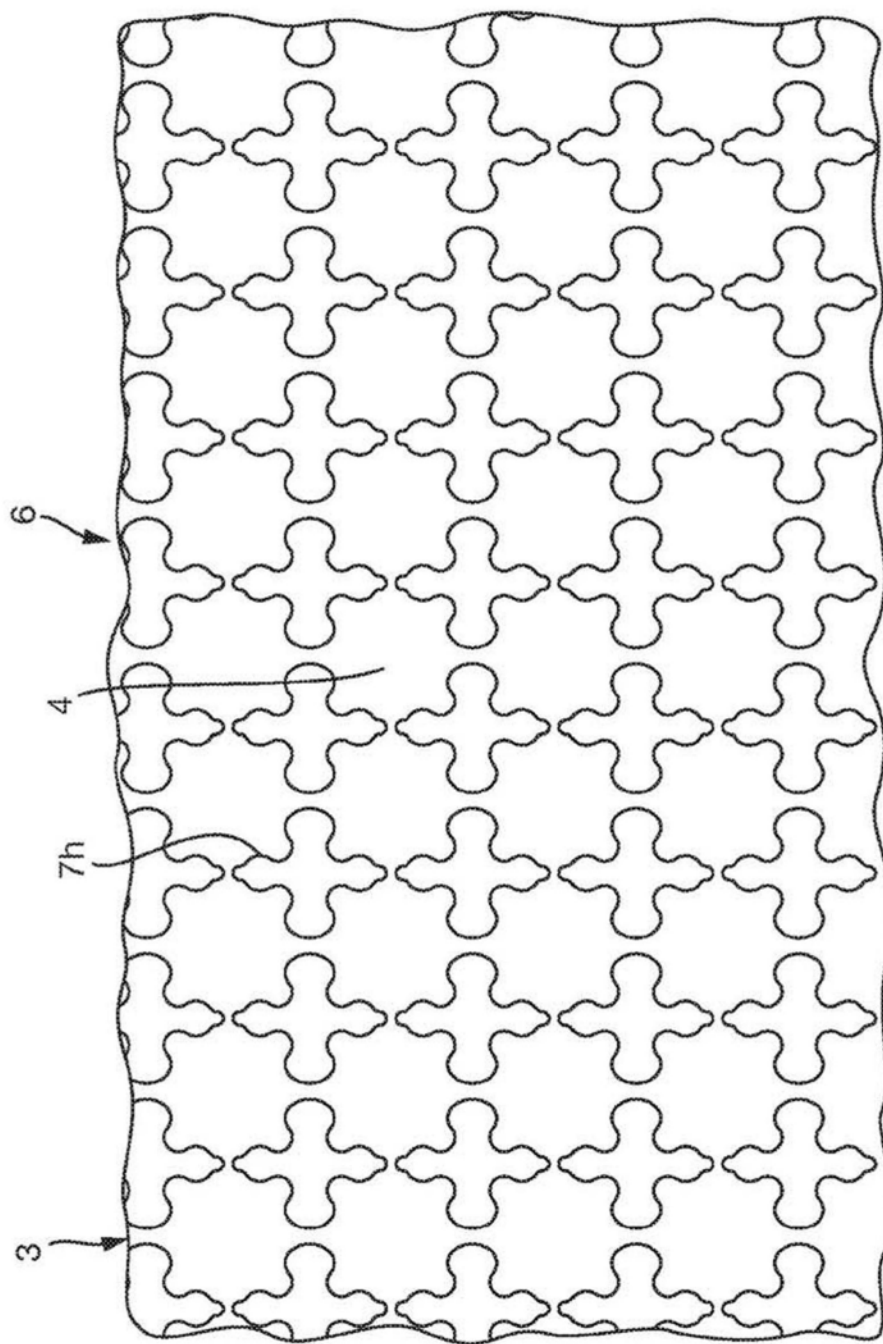


图8

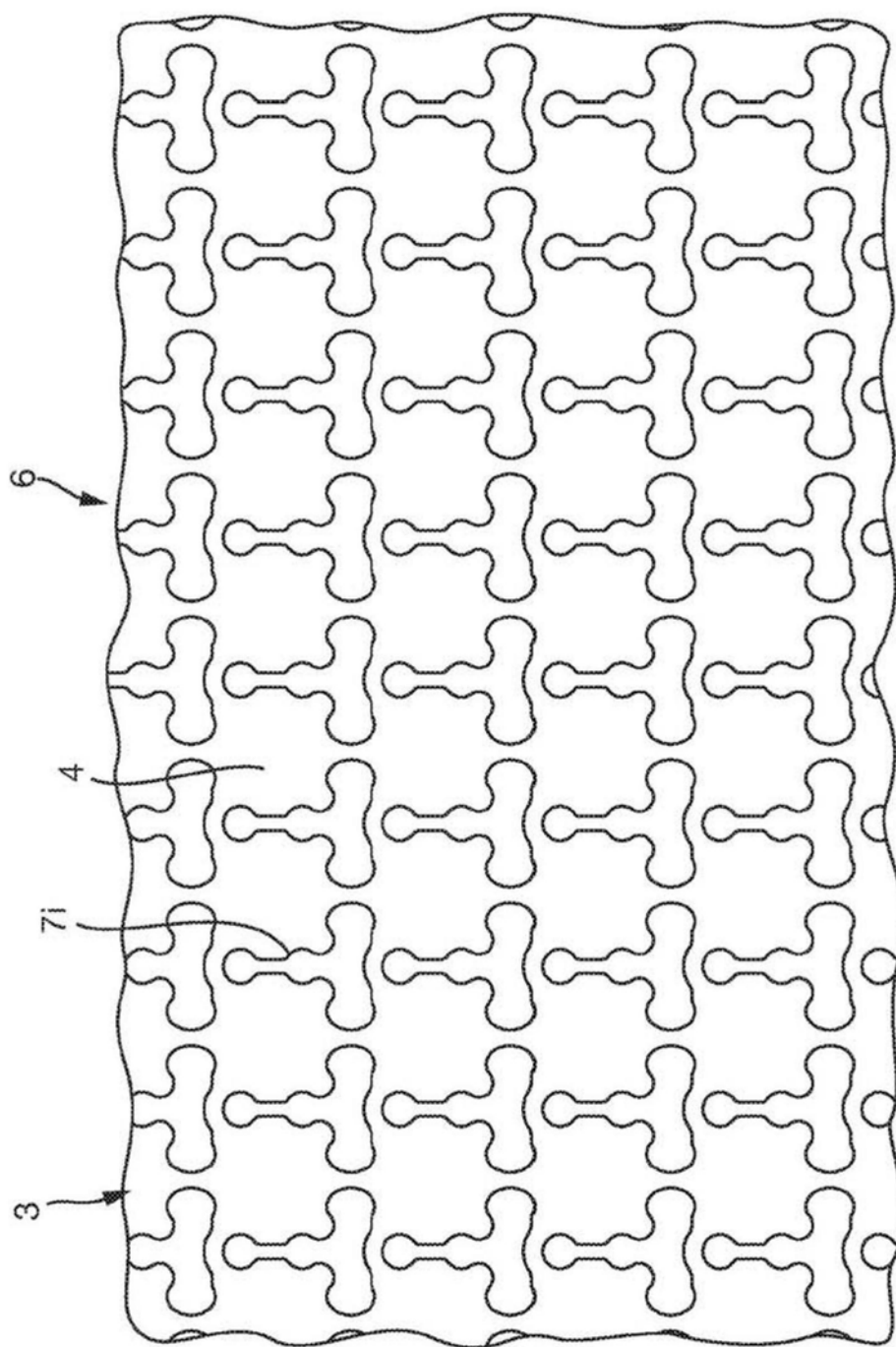


图9

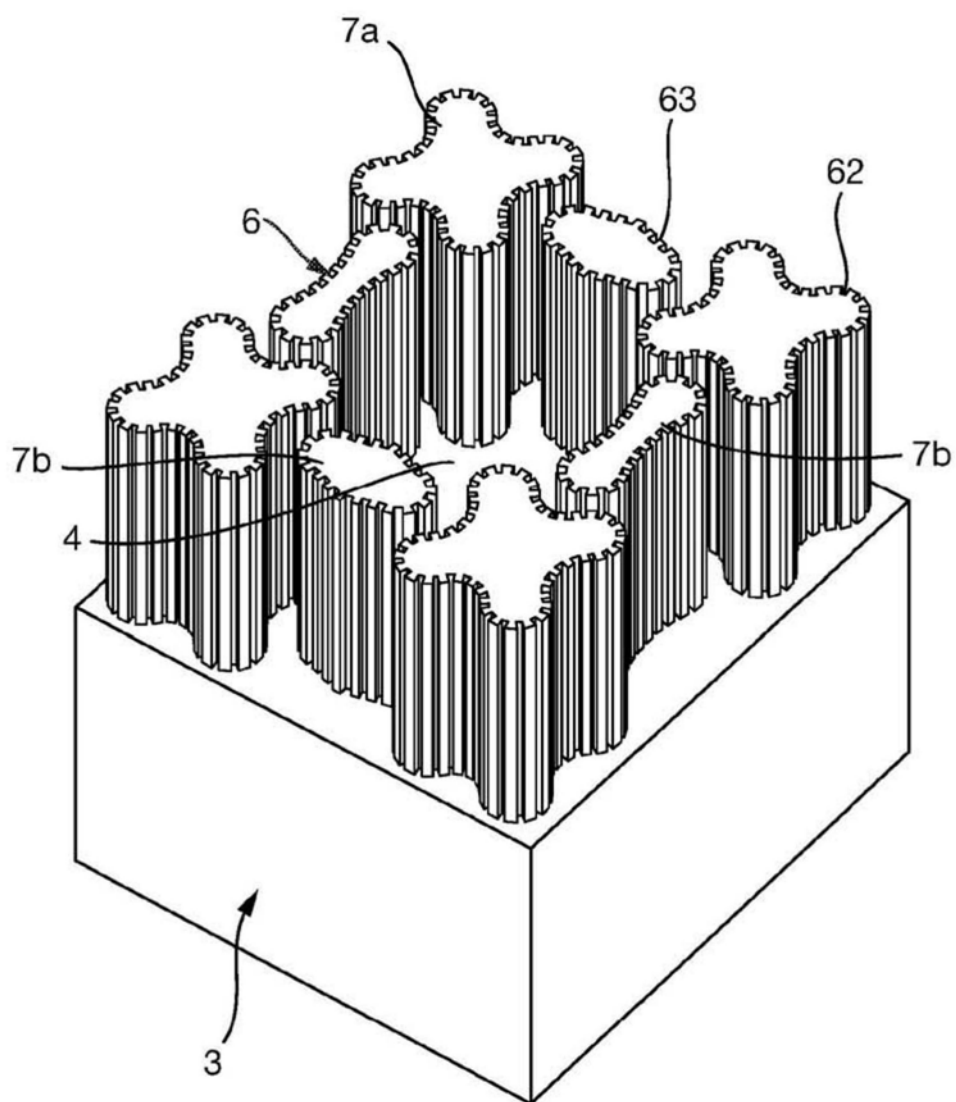


图10

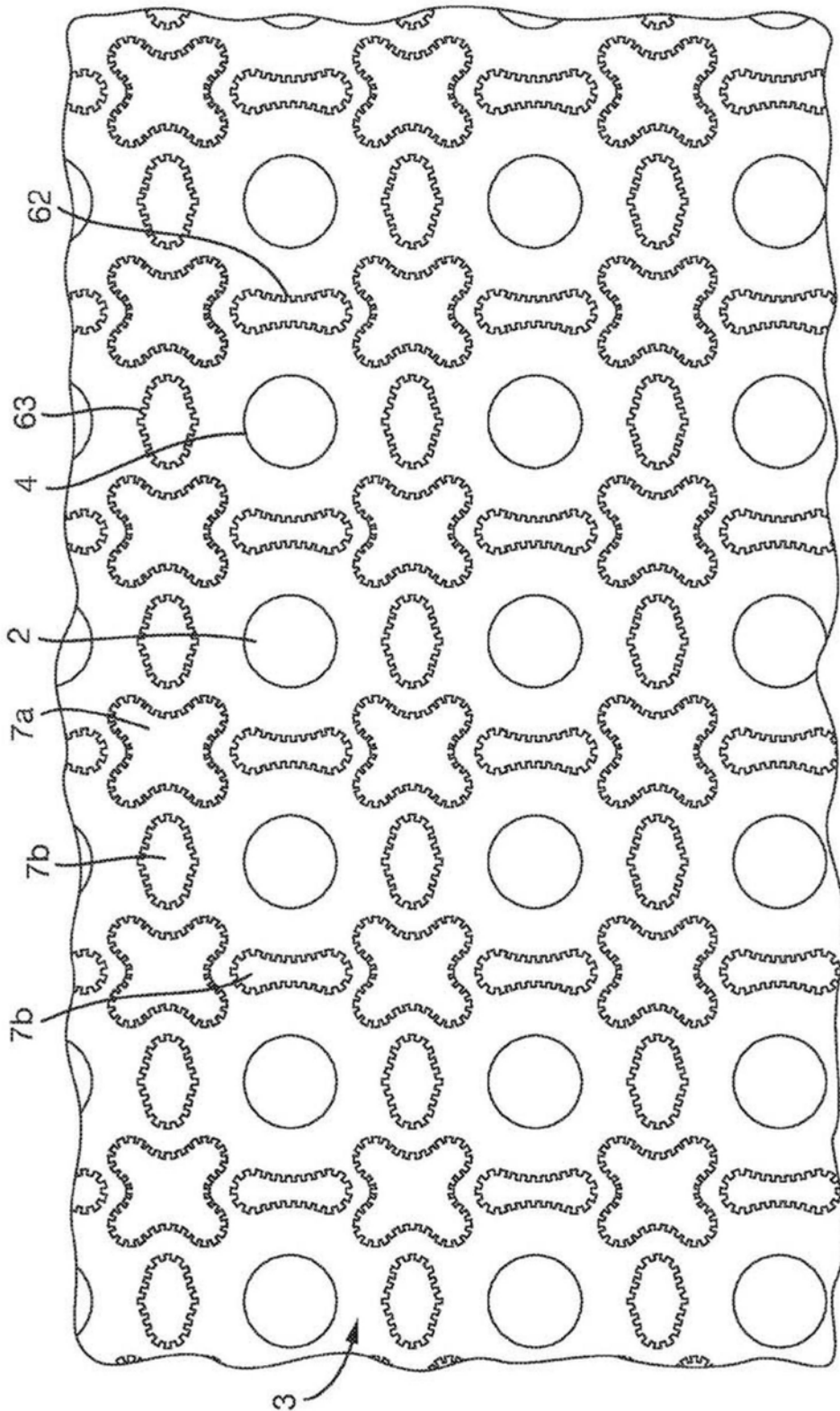


图11

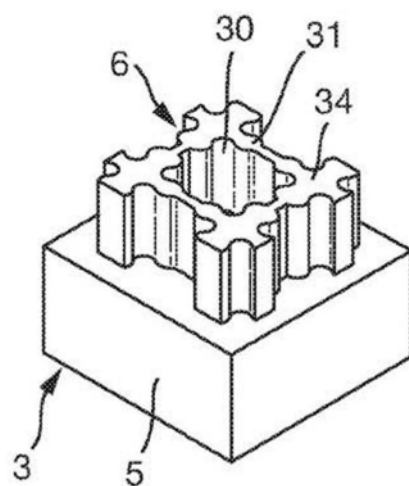


图12

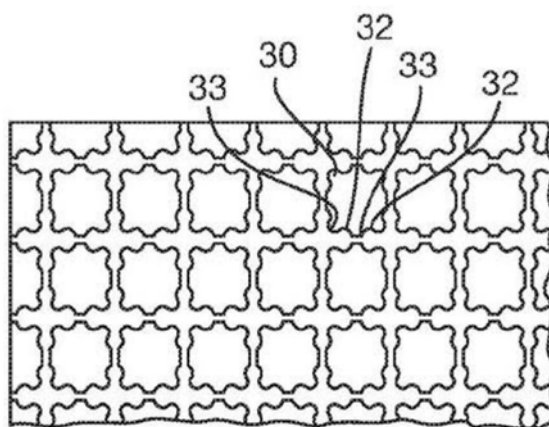


图13

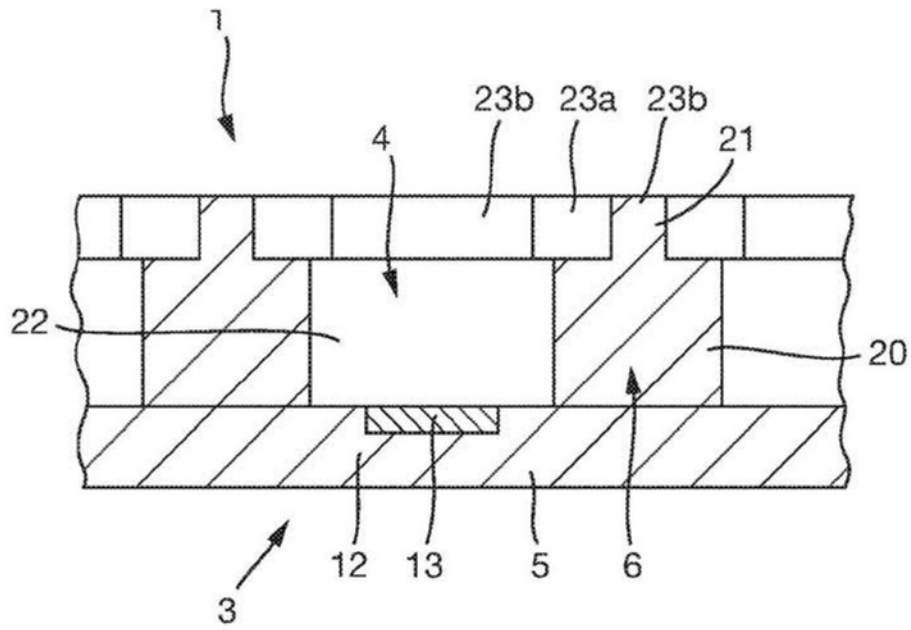


图14

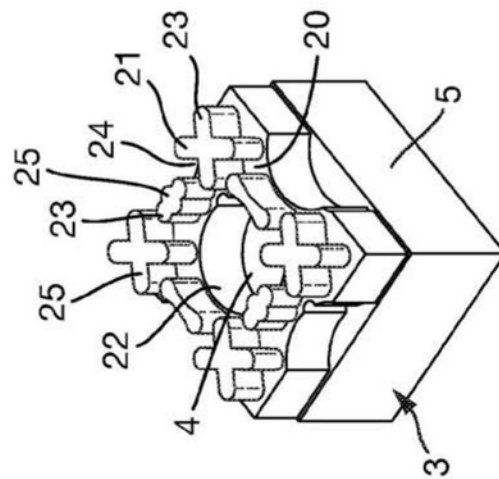


图15

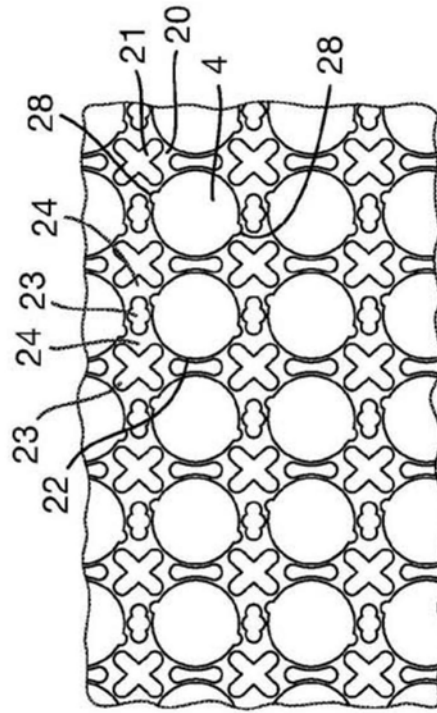


图16

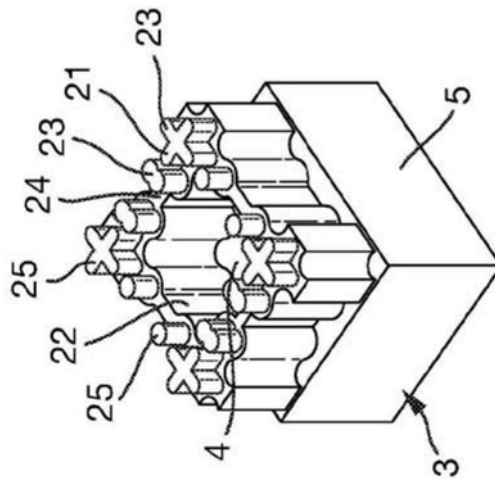


图17

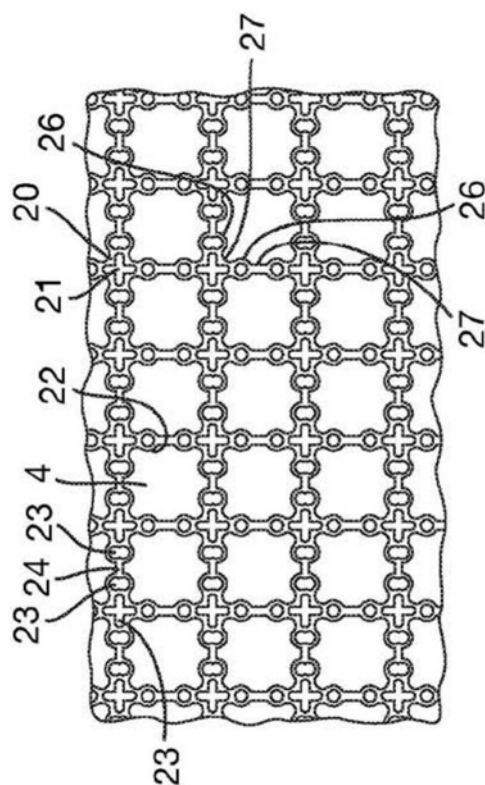


图18

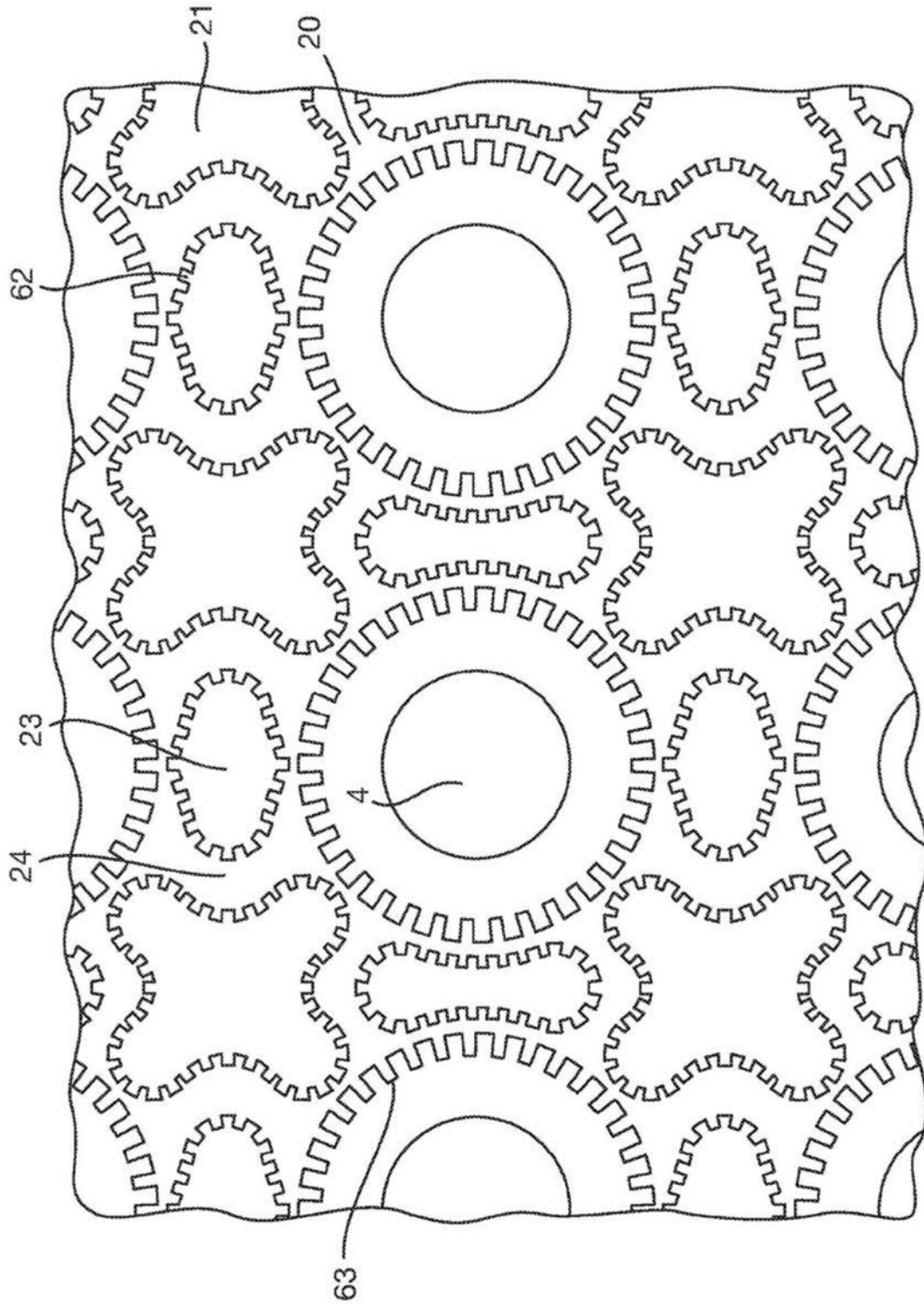


图20

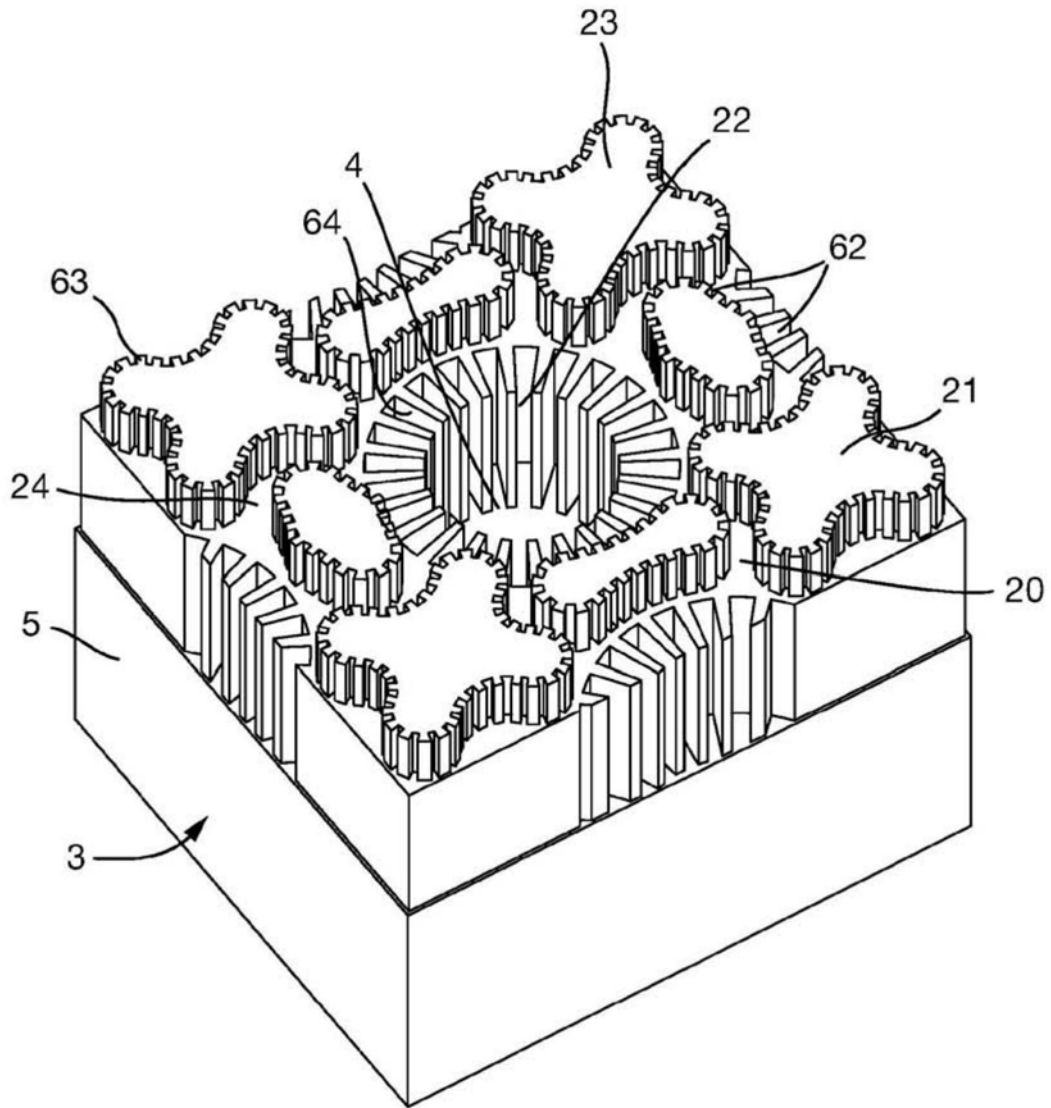


图21

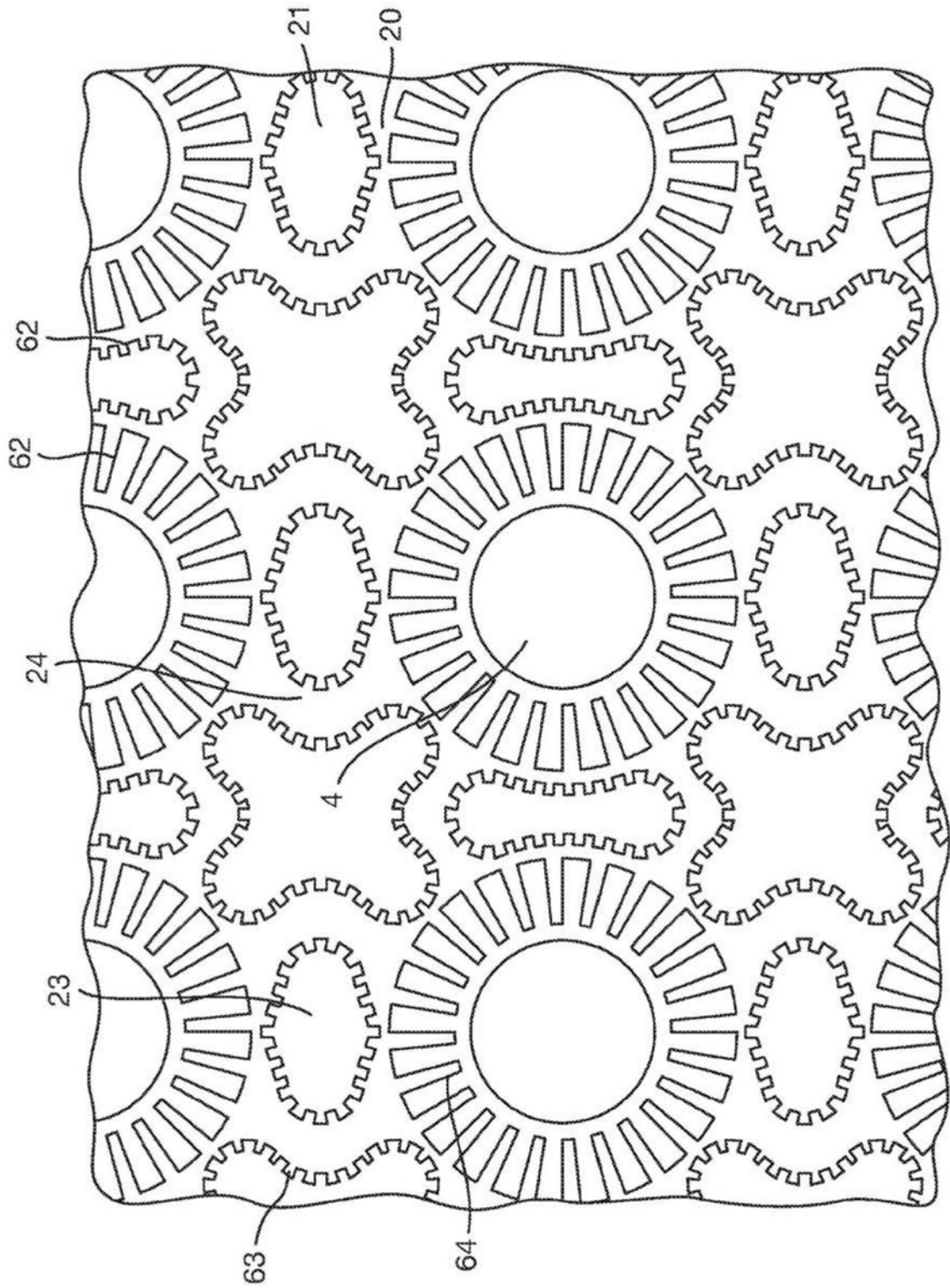


图22

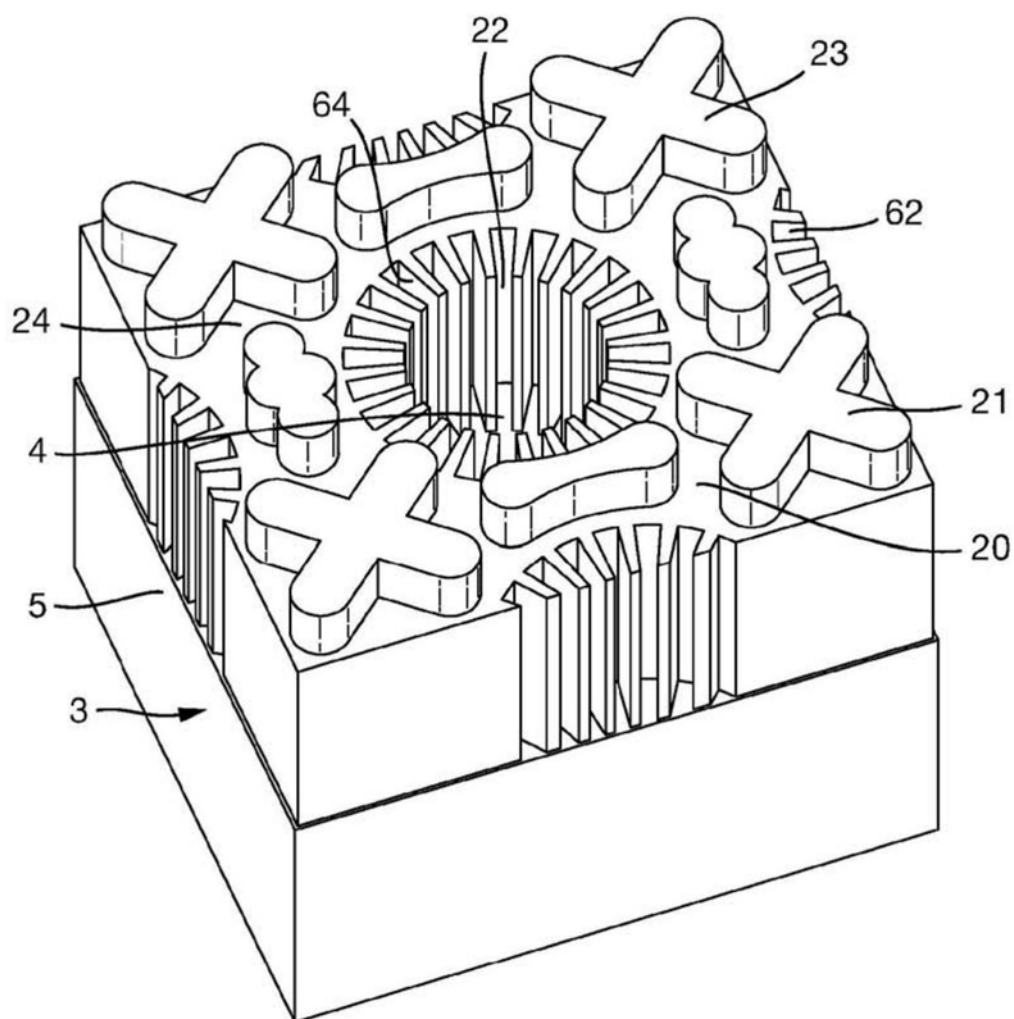


图23

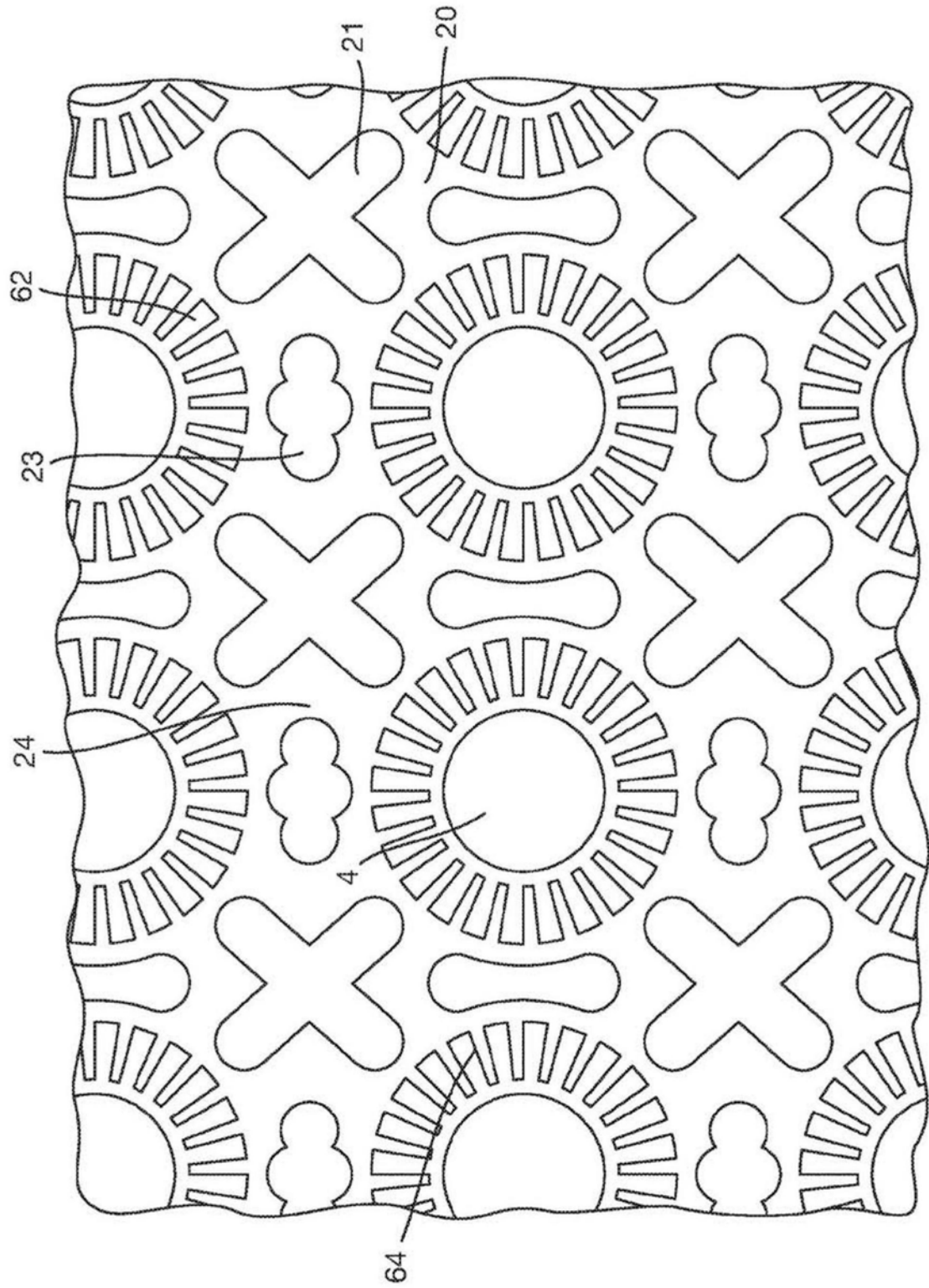


图24

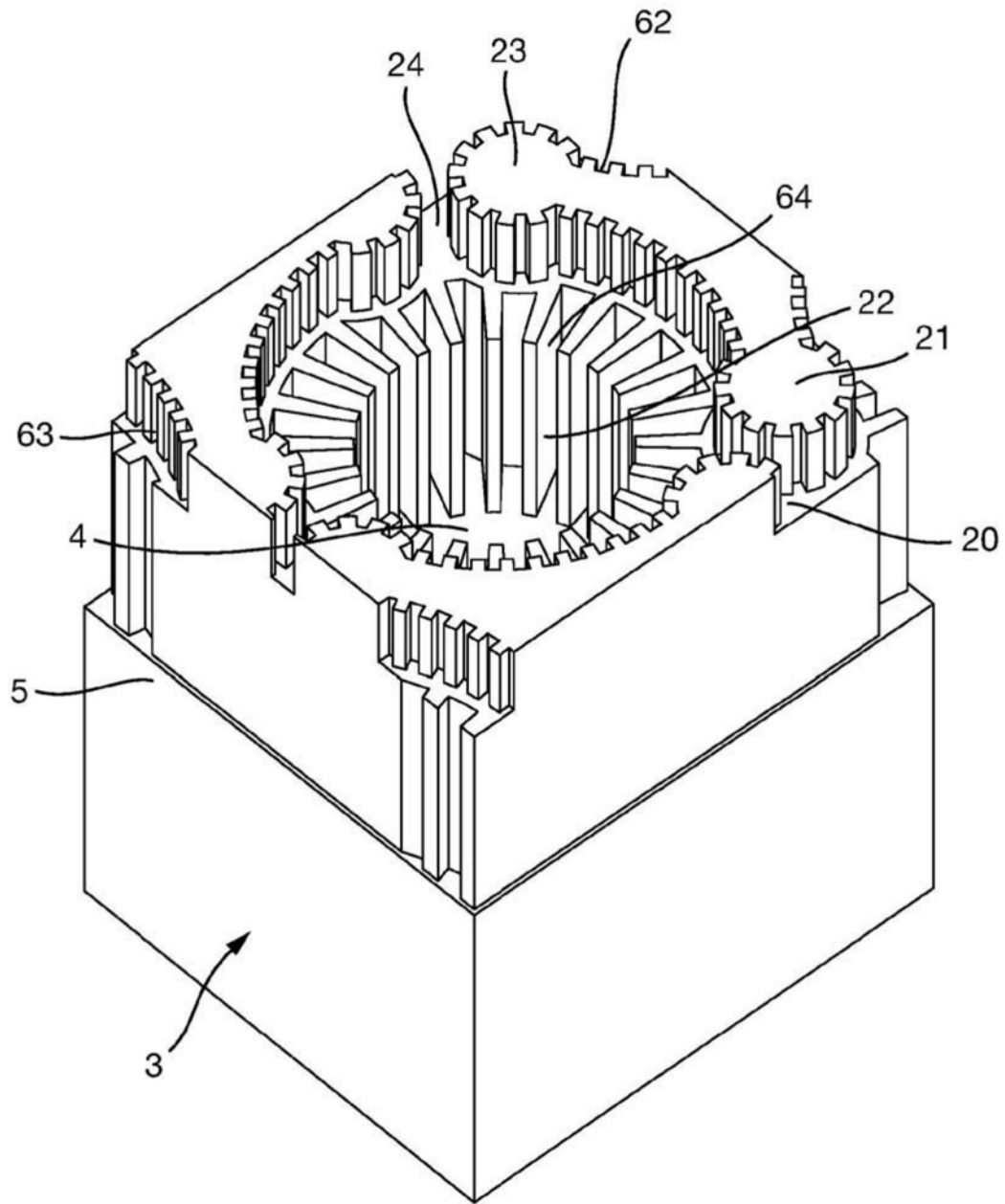


图25

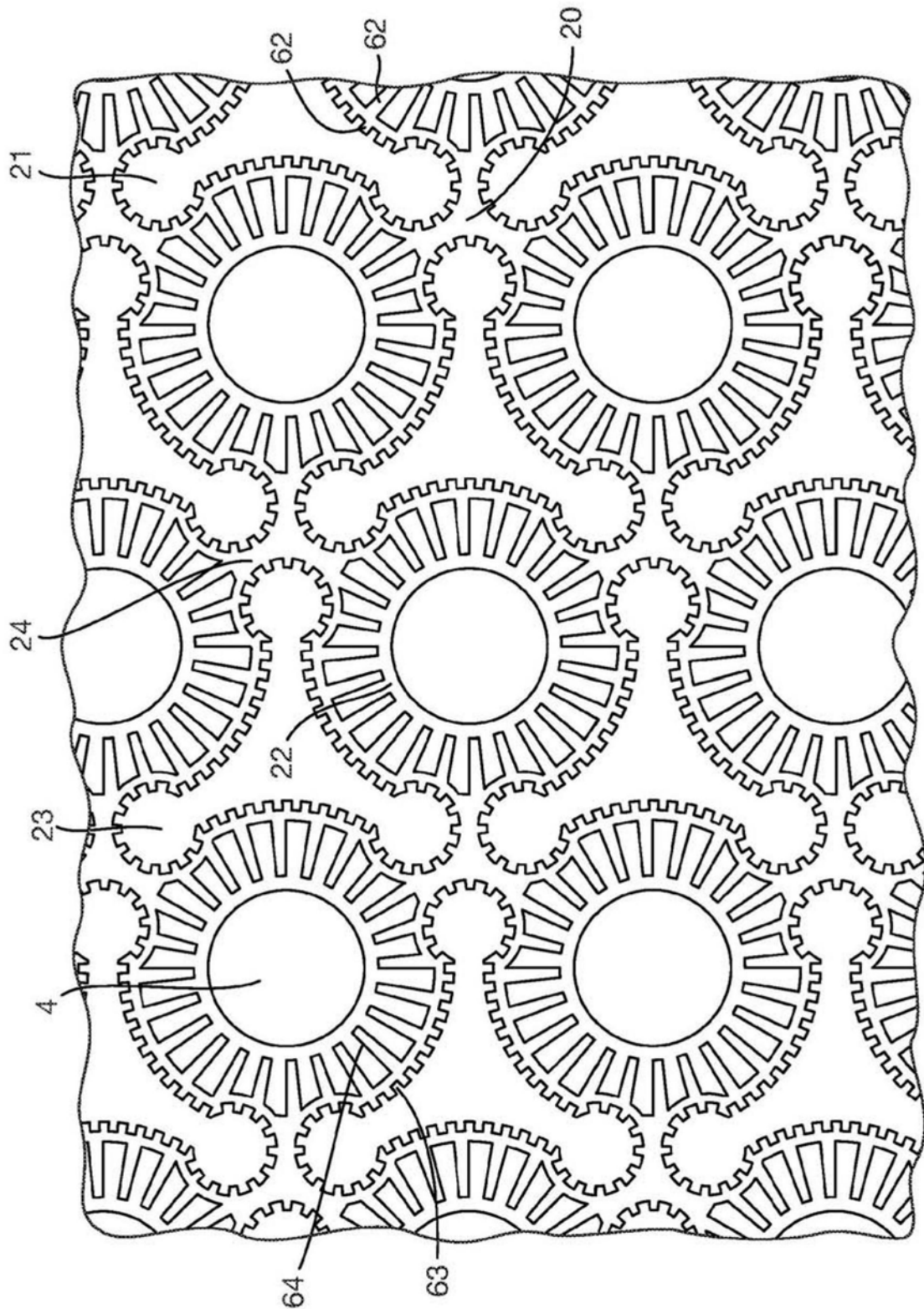


图26

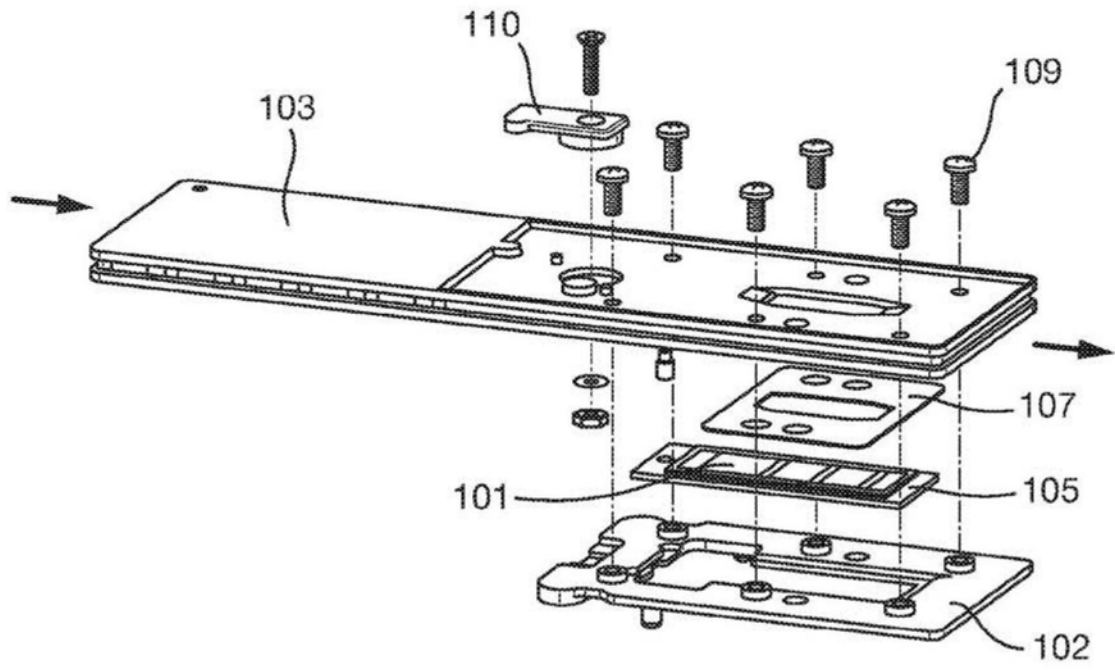


图27

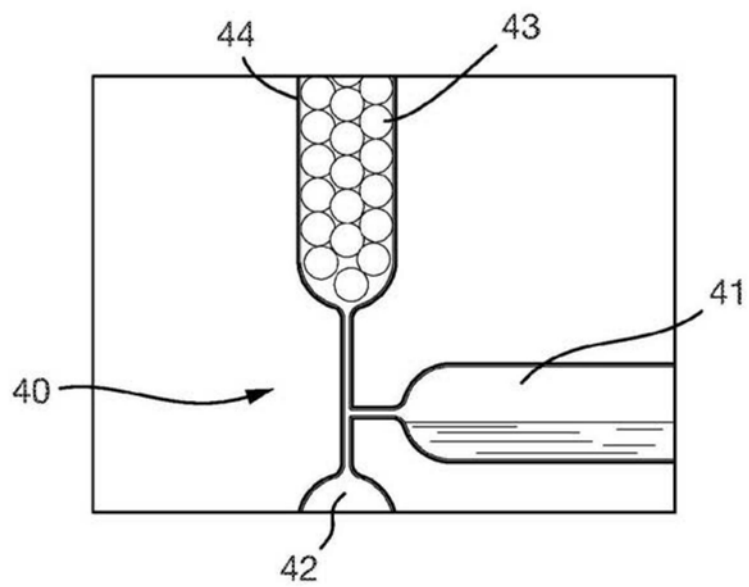


图28

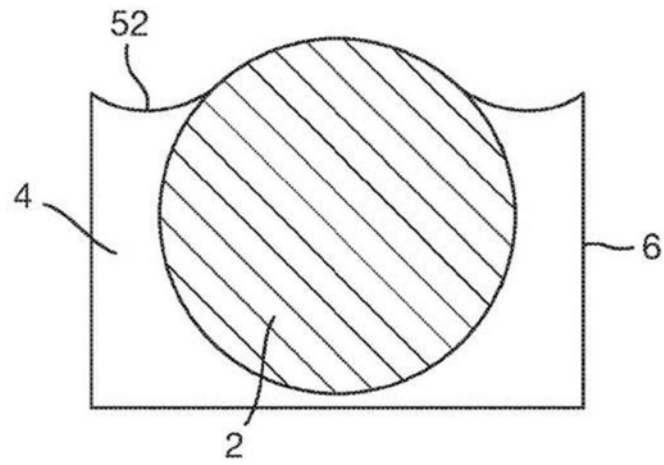


图29

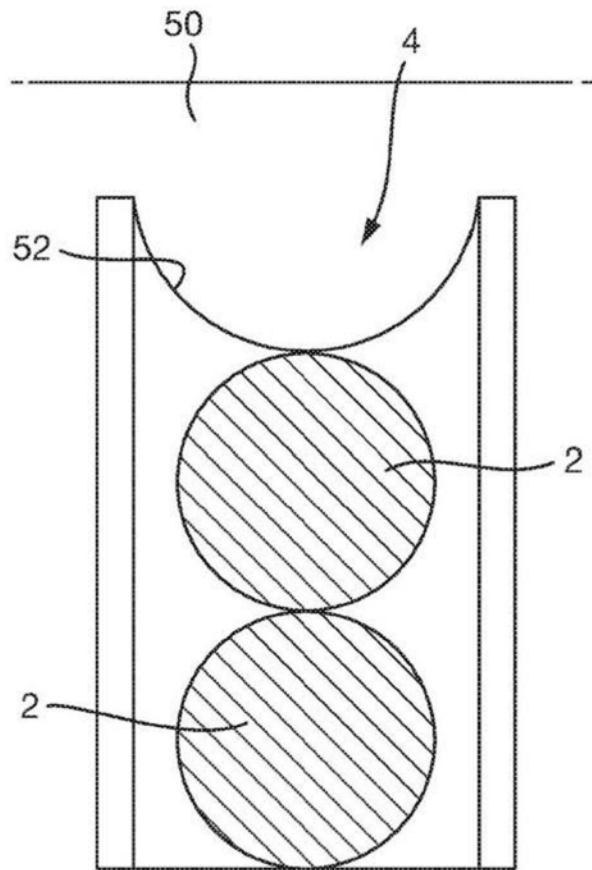


图30

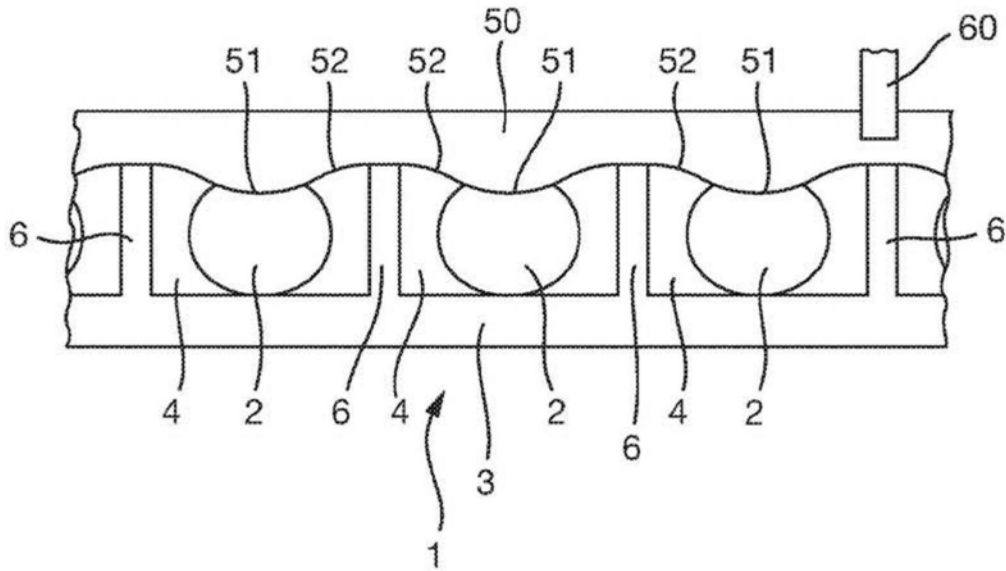


图31

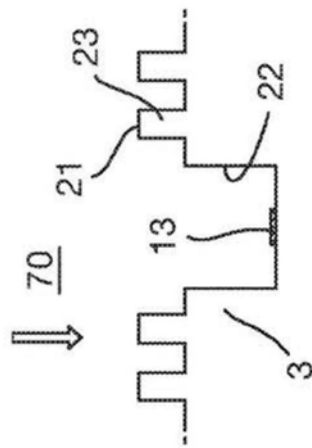


图32a

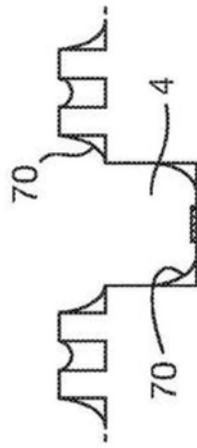


图32b

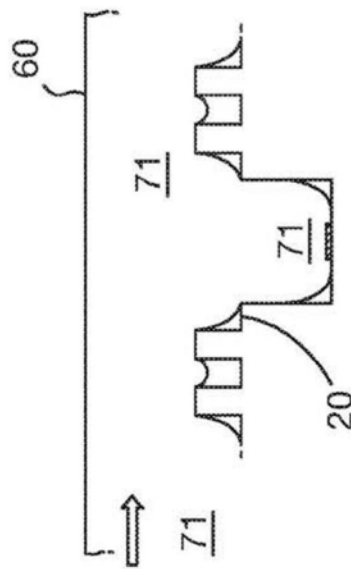


图32c

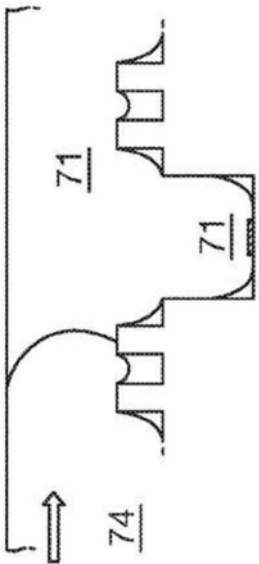


图32d

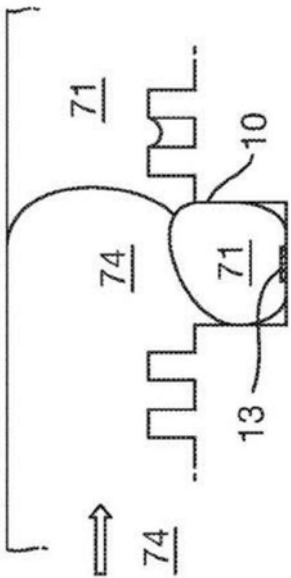


图32e

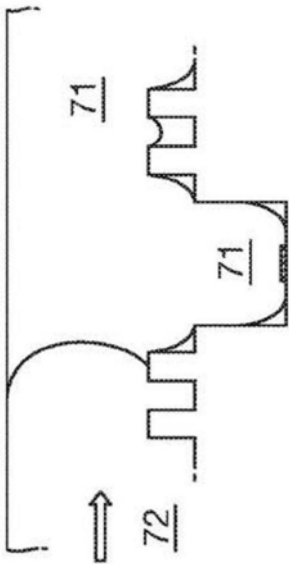


图32f

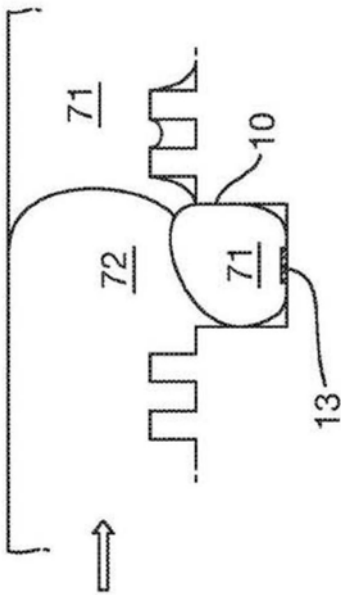


图32g

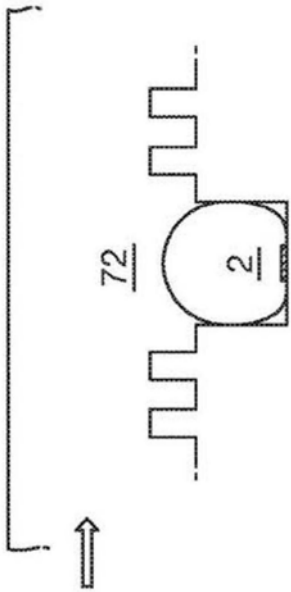


图32h

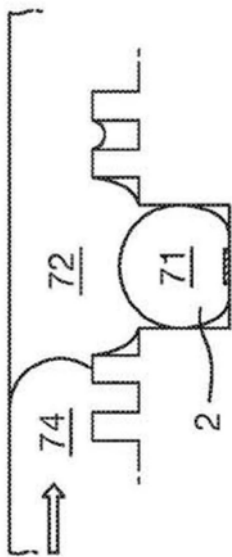


图32i

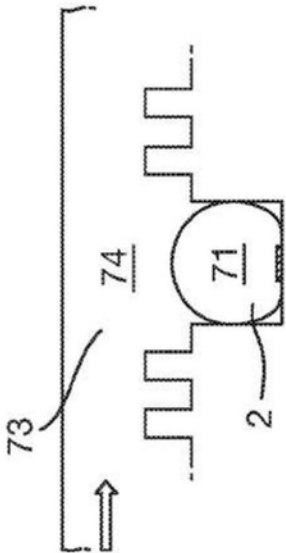


图32j

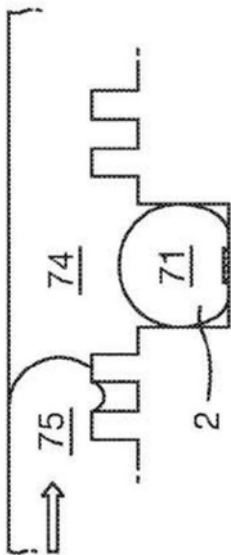


图32k

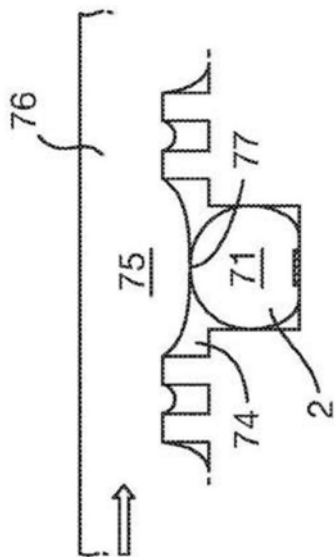


图321

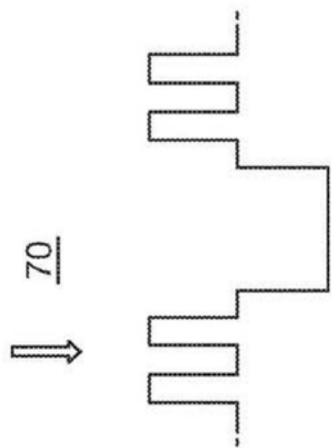


图33a

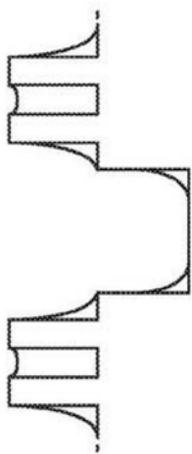


图33b

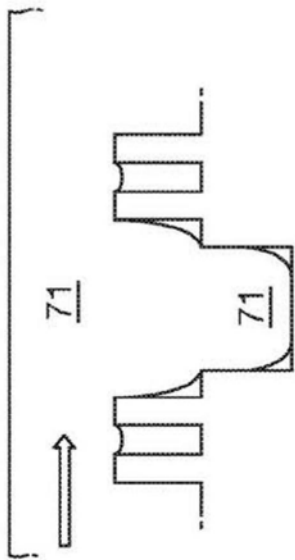


图33c

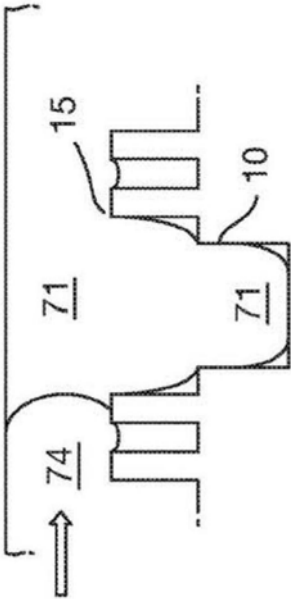


图33d

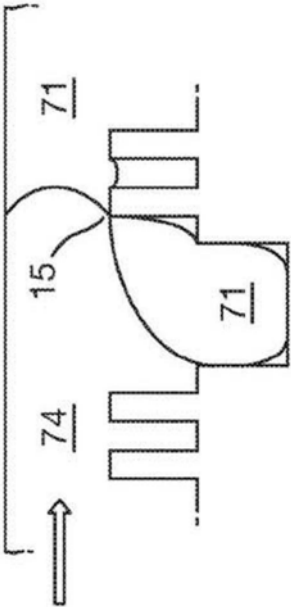


图33e

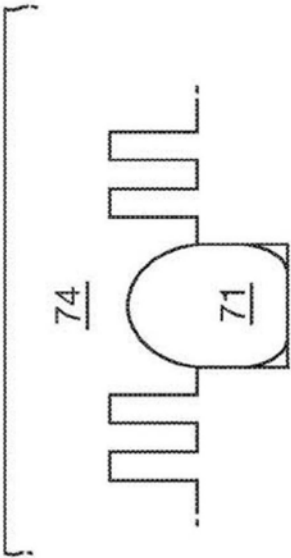


图33f

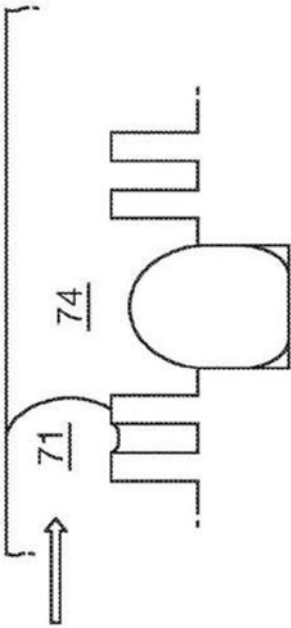


图33g

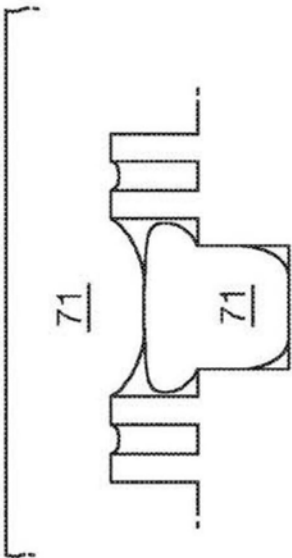


图33h

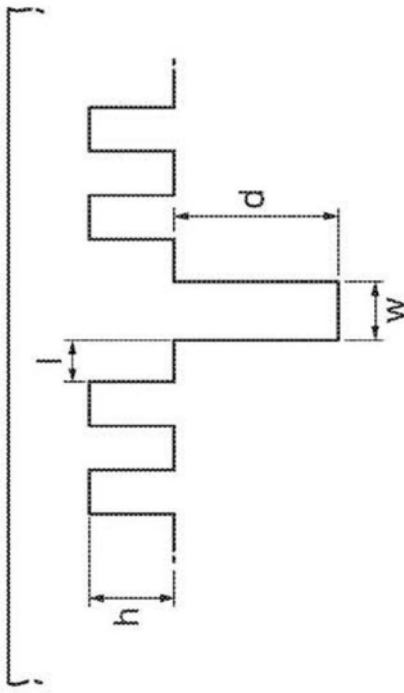


图34a

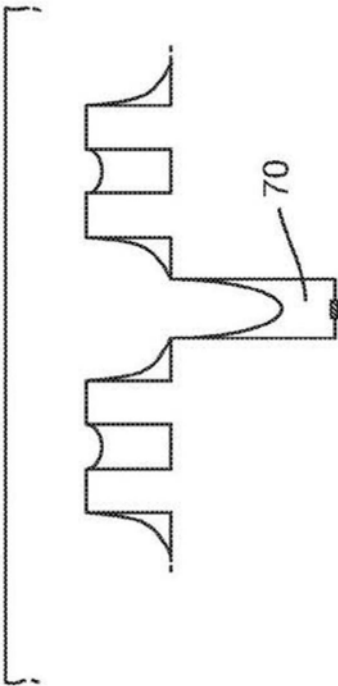


图34b

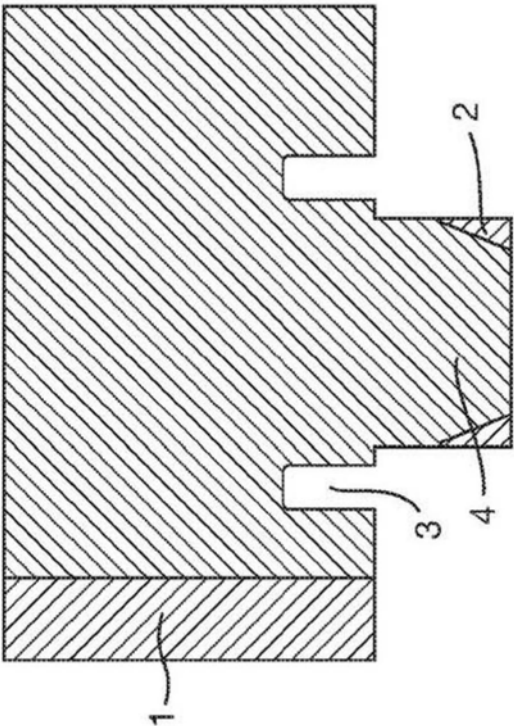


图35

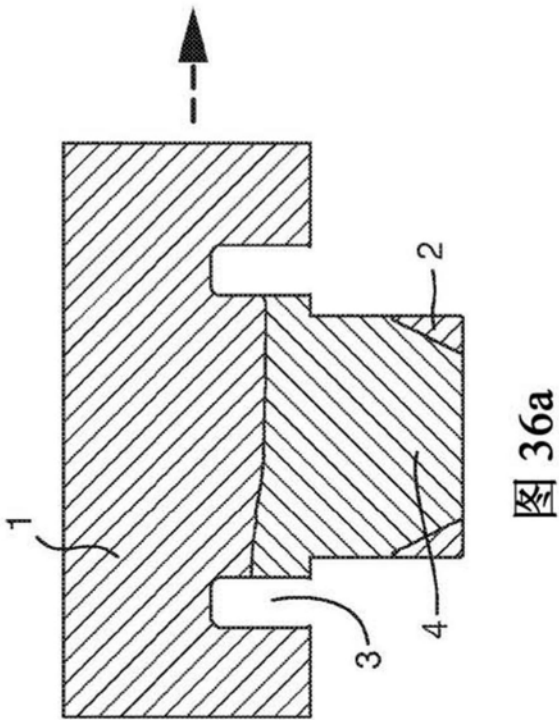


图 36a

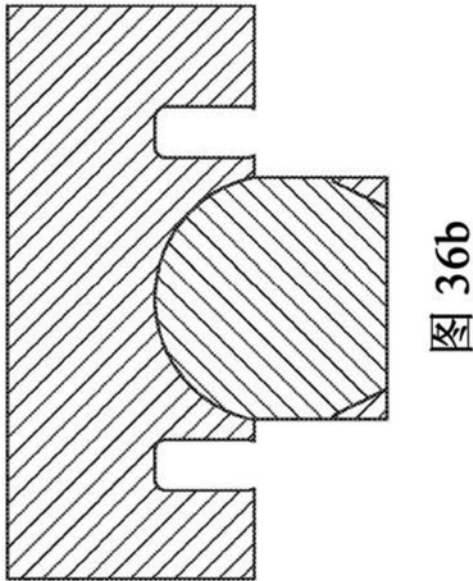


图 36b

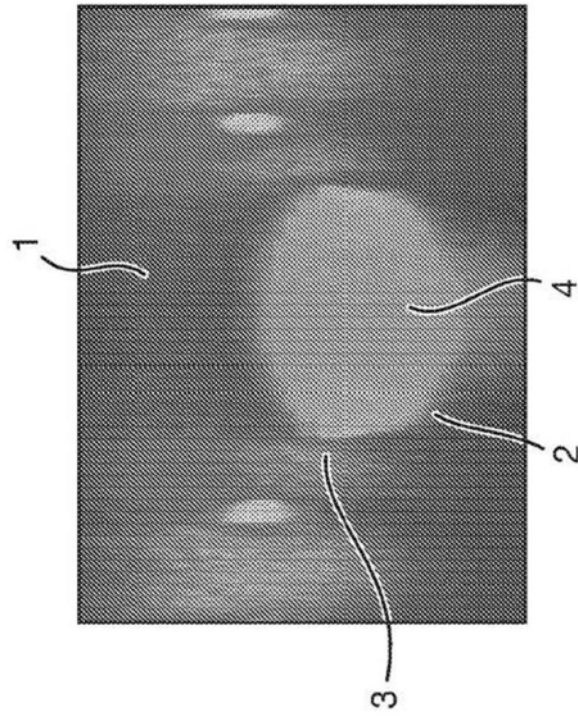


图36c

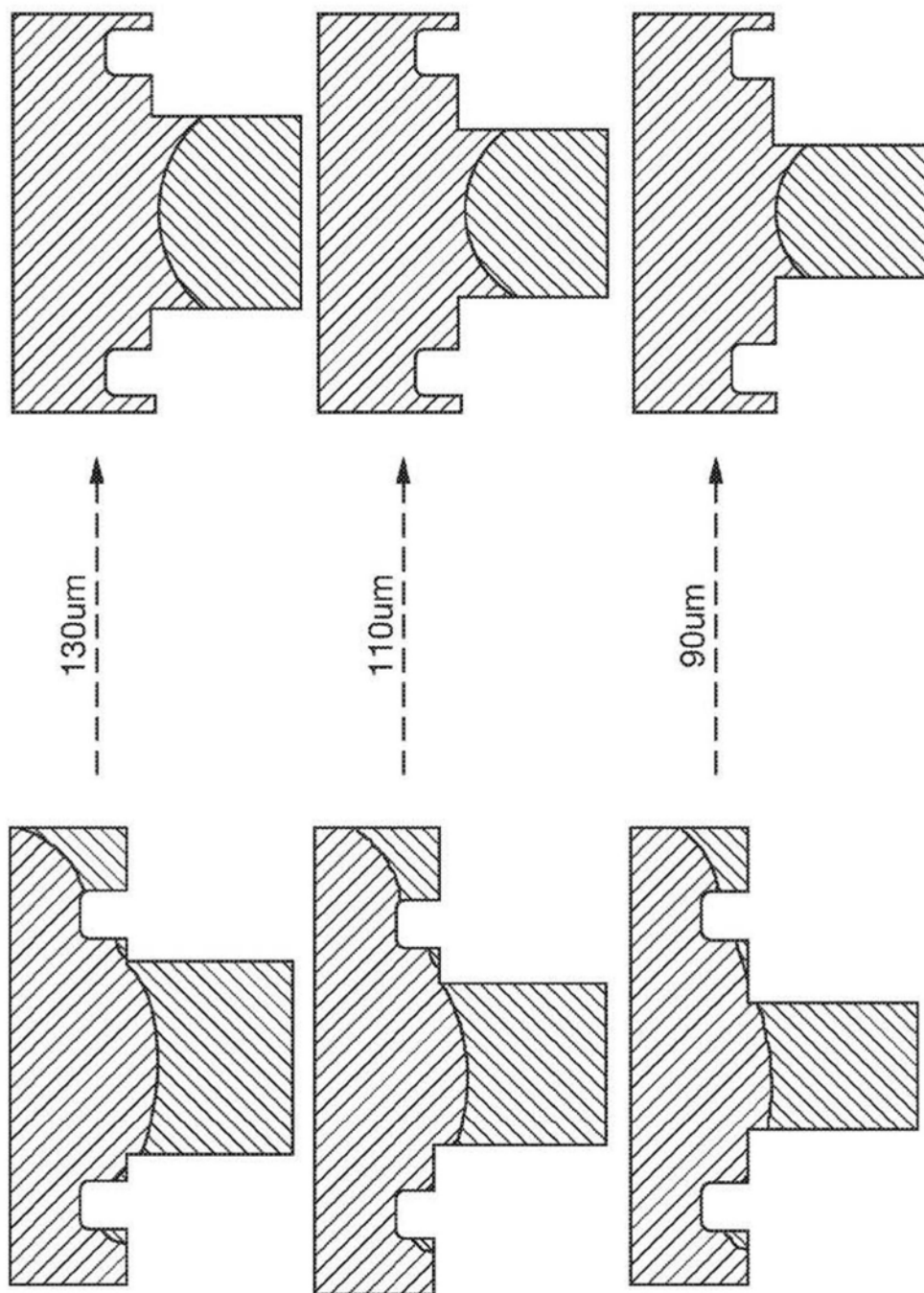


图37

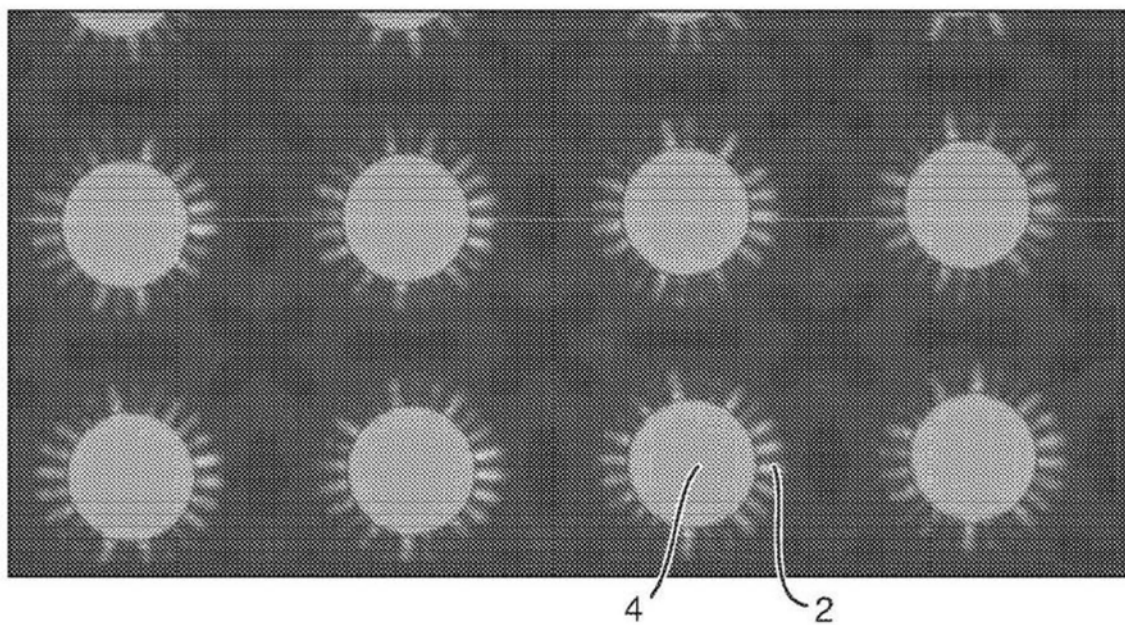


图38a

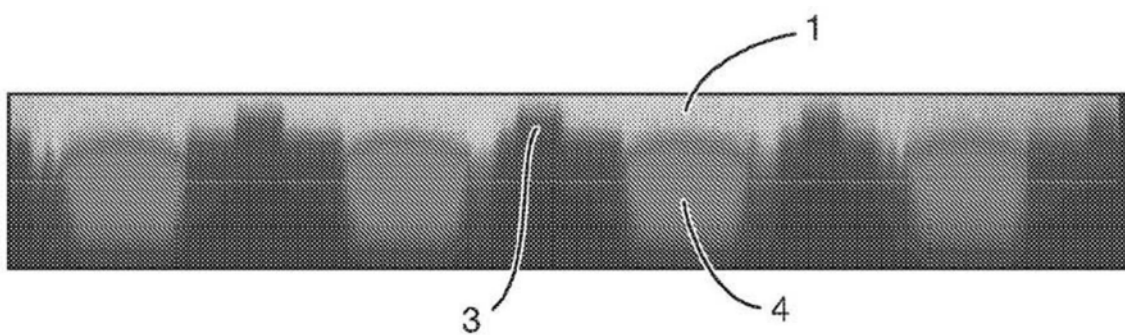


图38b

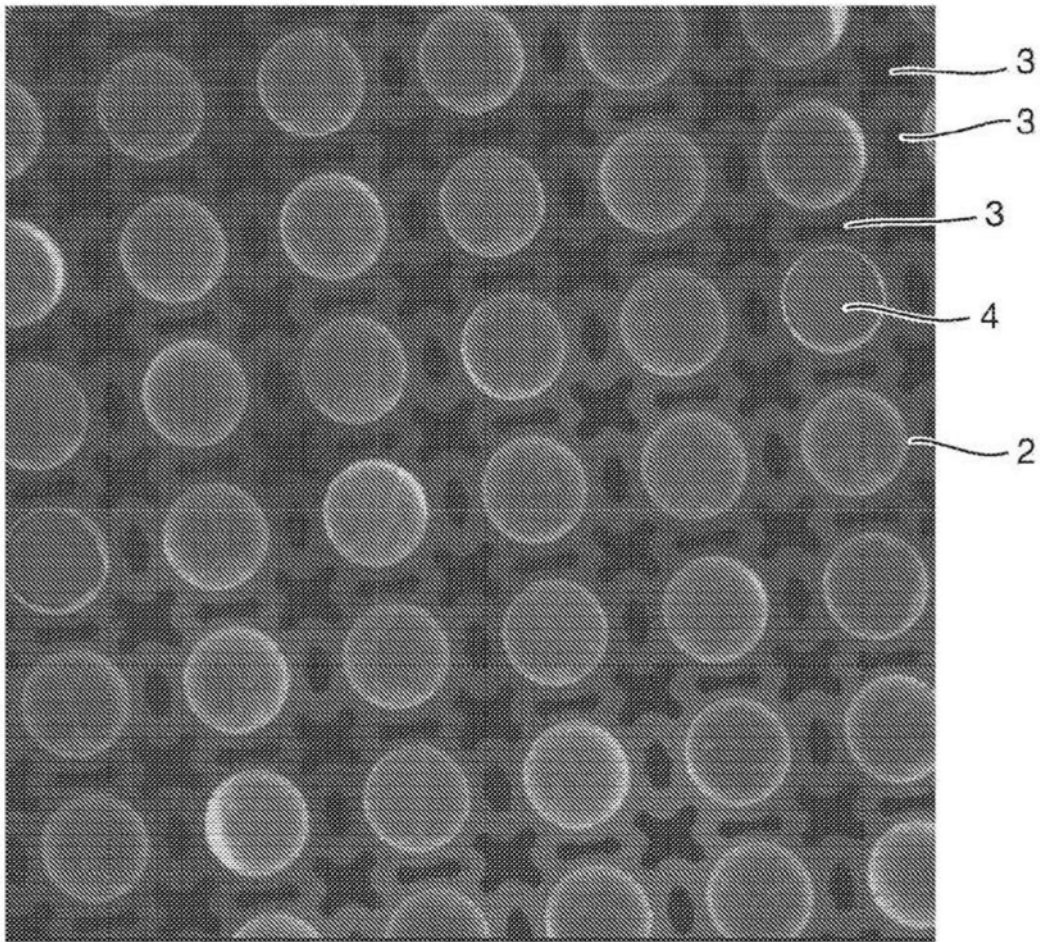


图39a

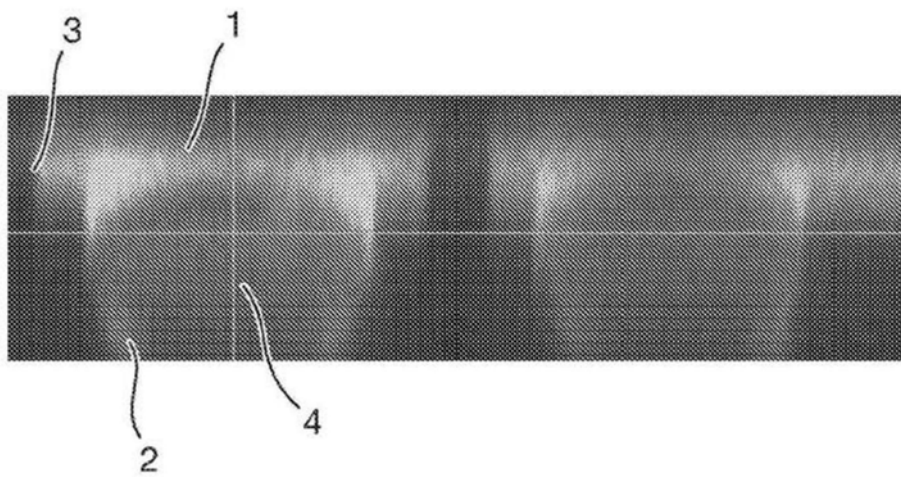


图39b

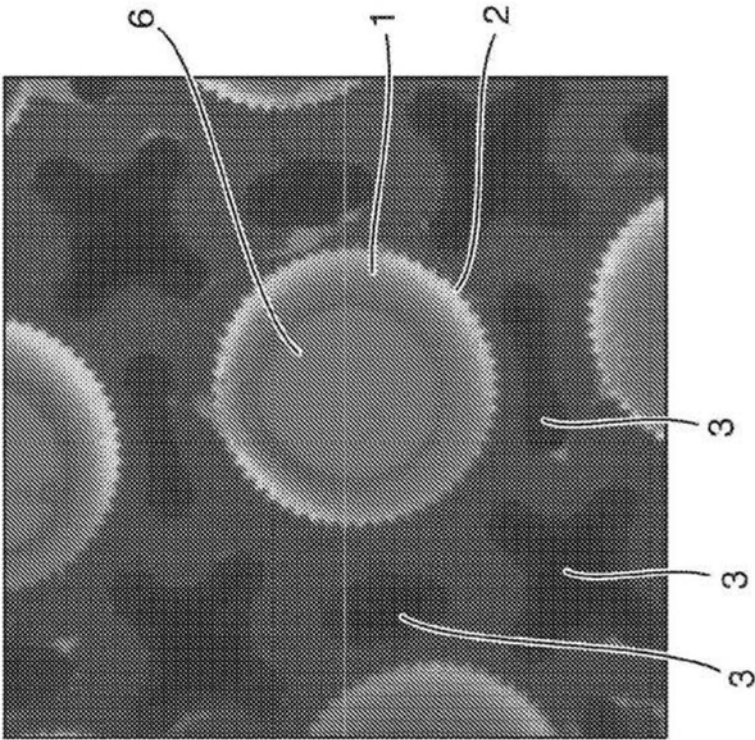


图40a

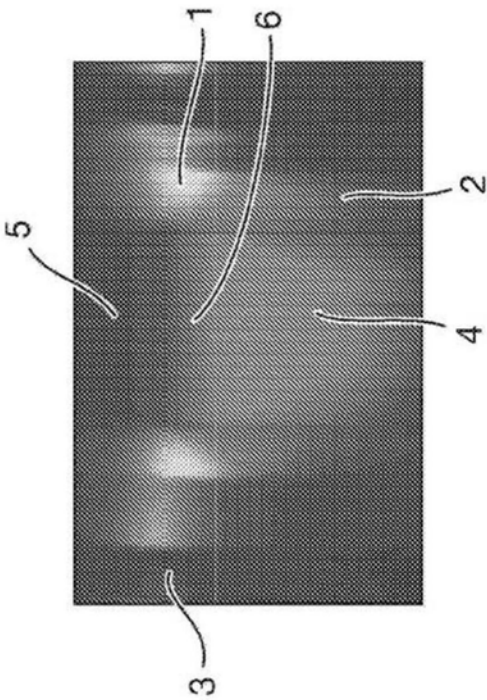


图40b

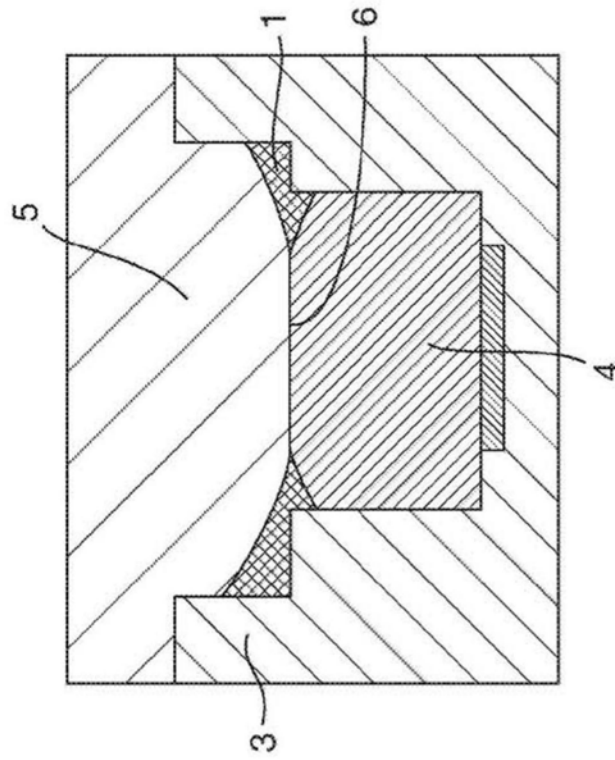


图40c

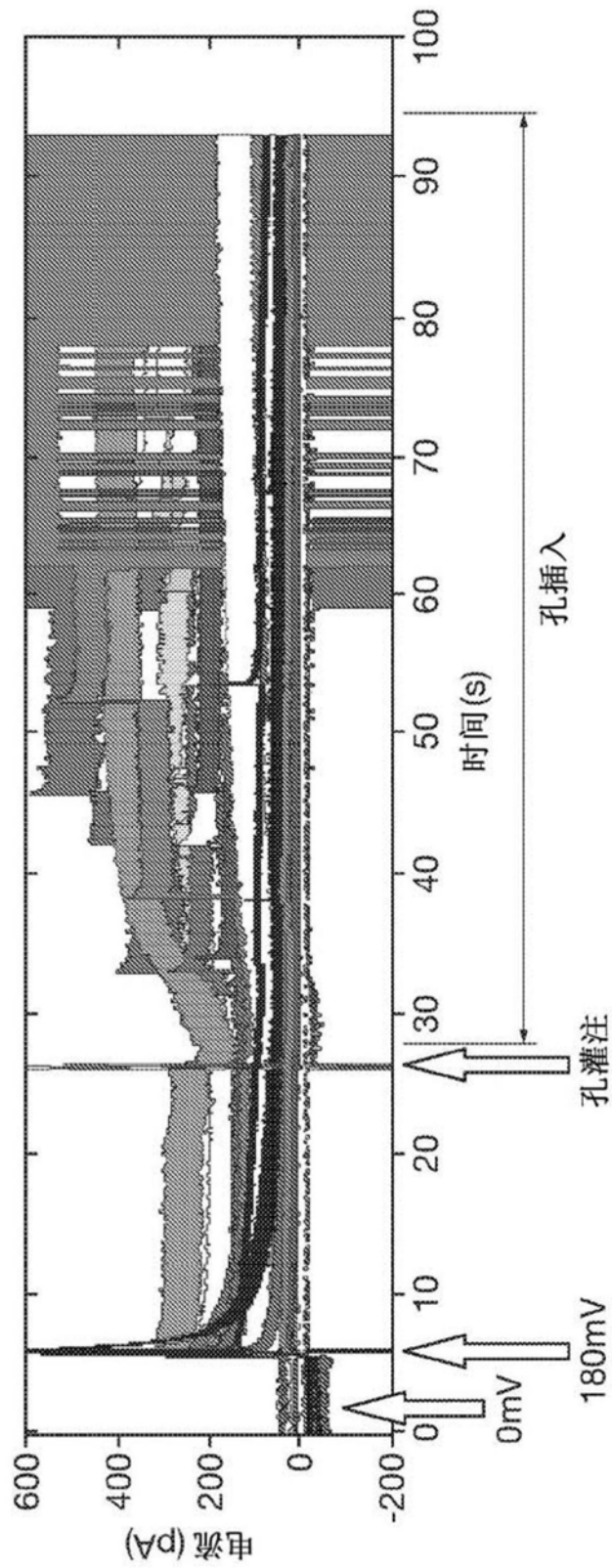


图41

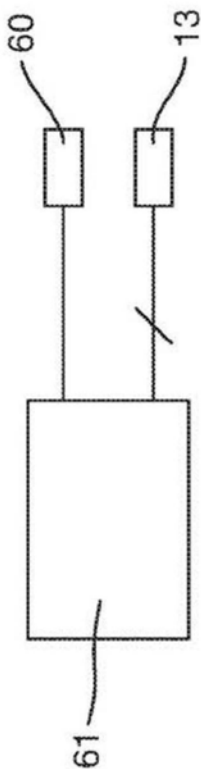


图42

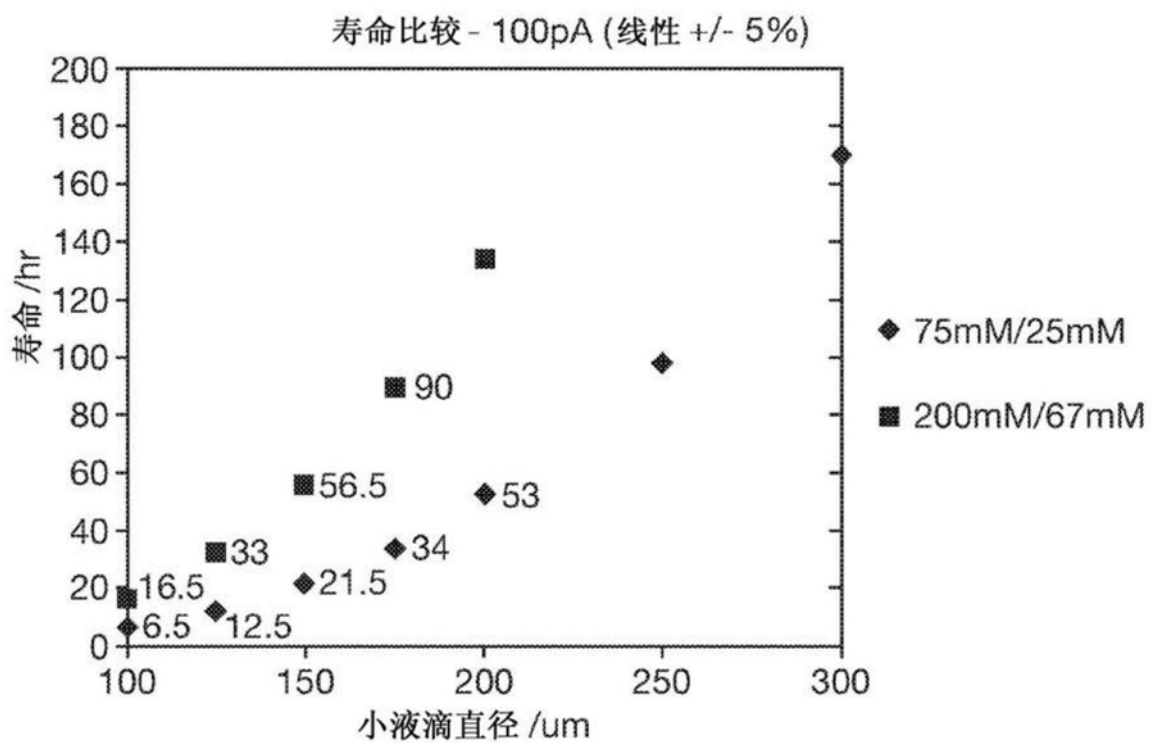


图43

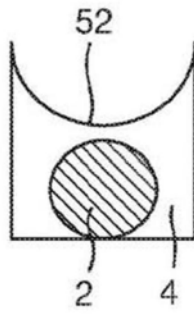


图44a

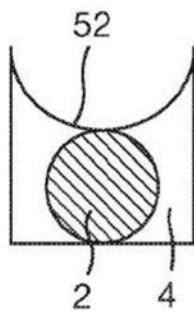


图44b

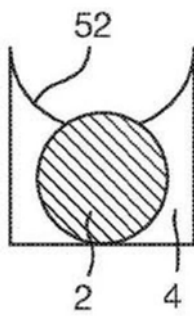


图44c

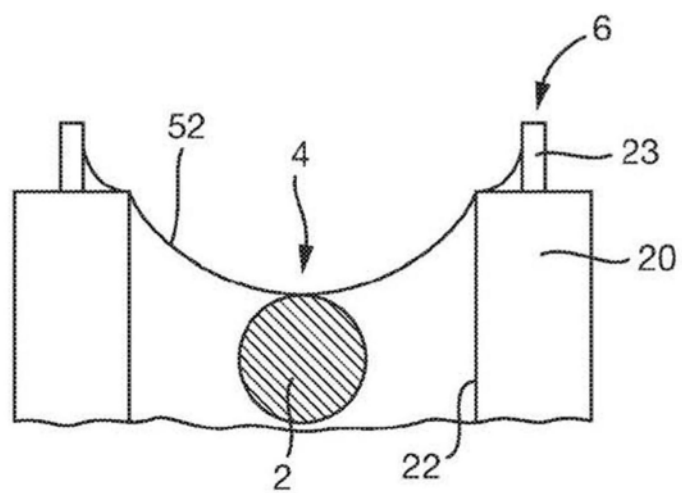


图45

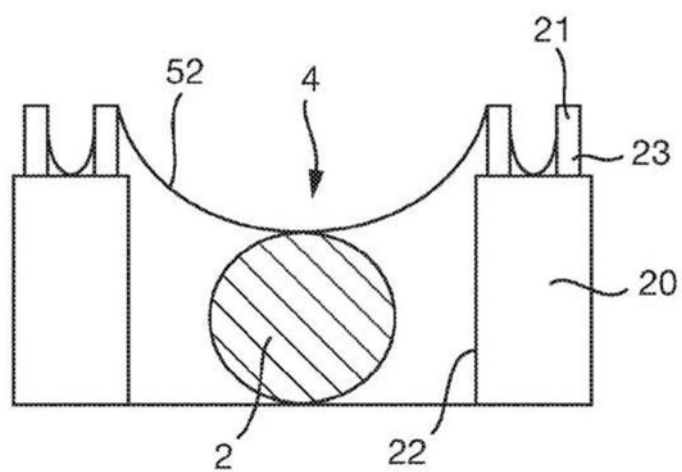


图46

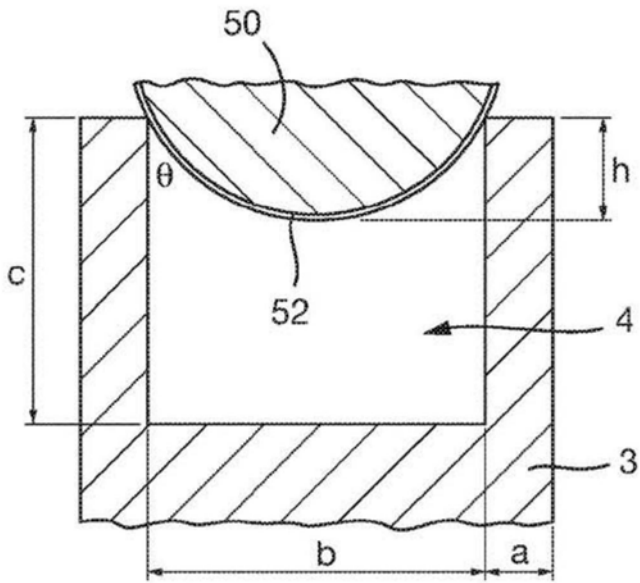


图47

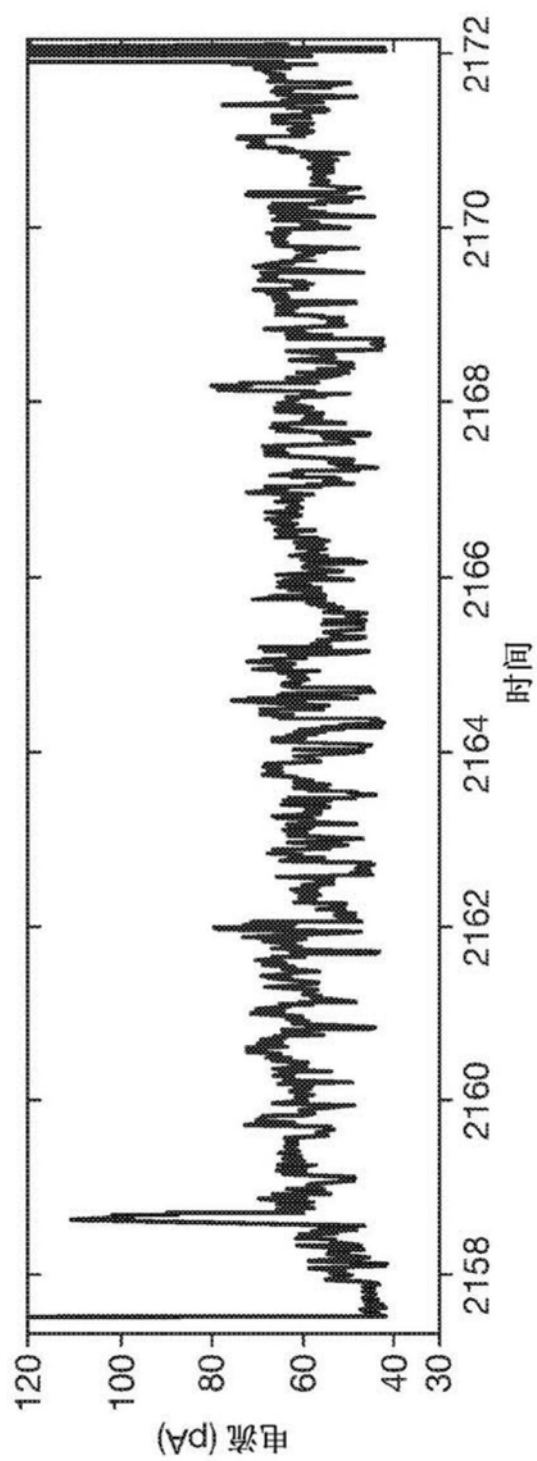


图48a

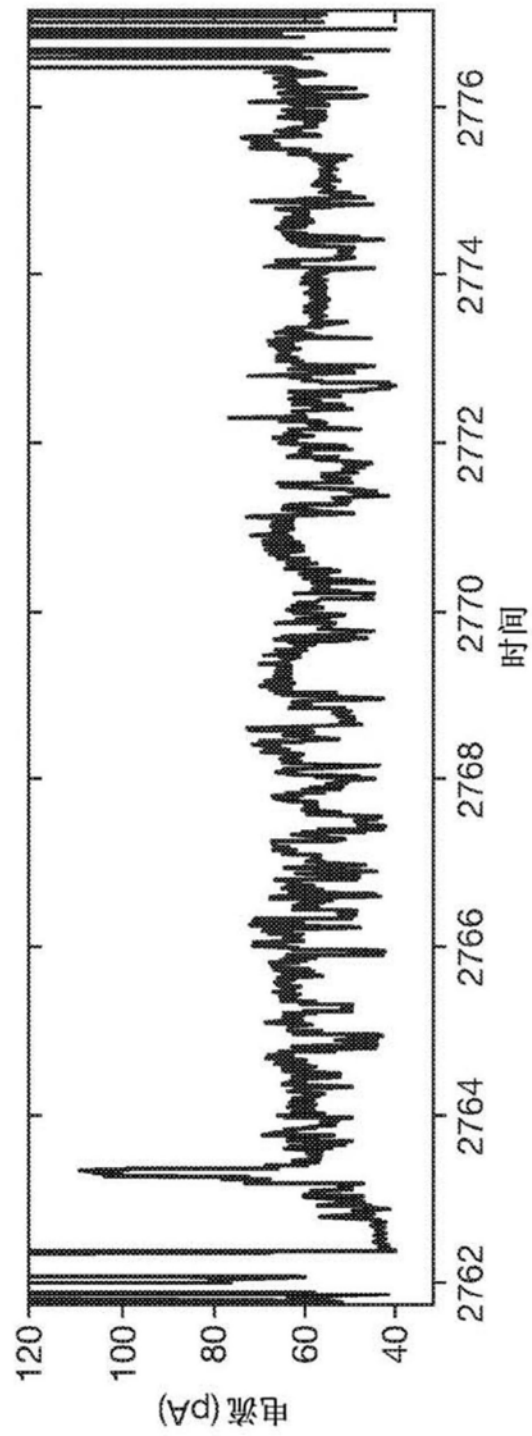


图48b

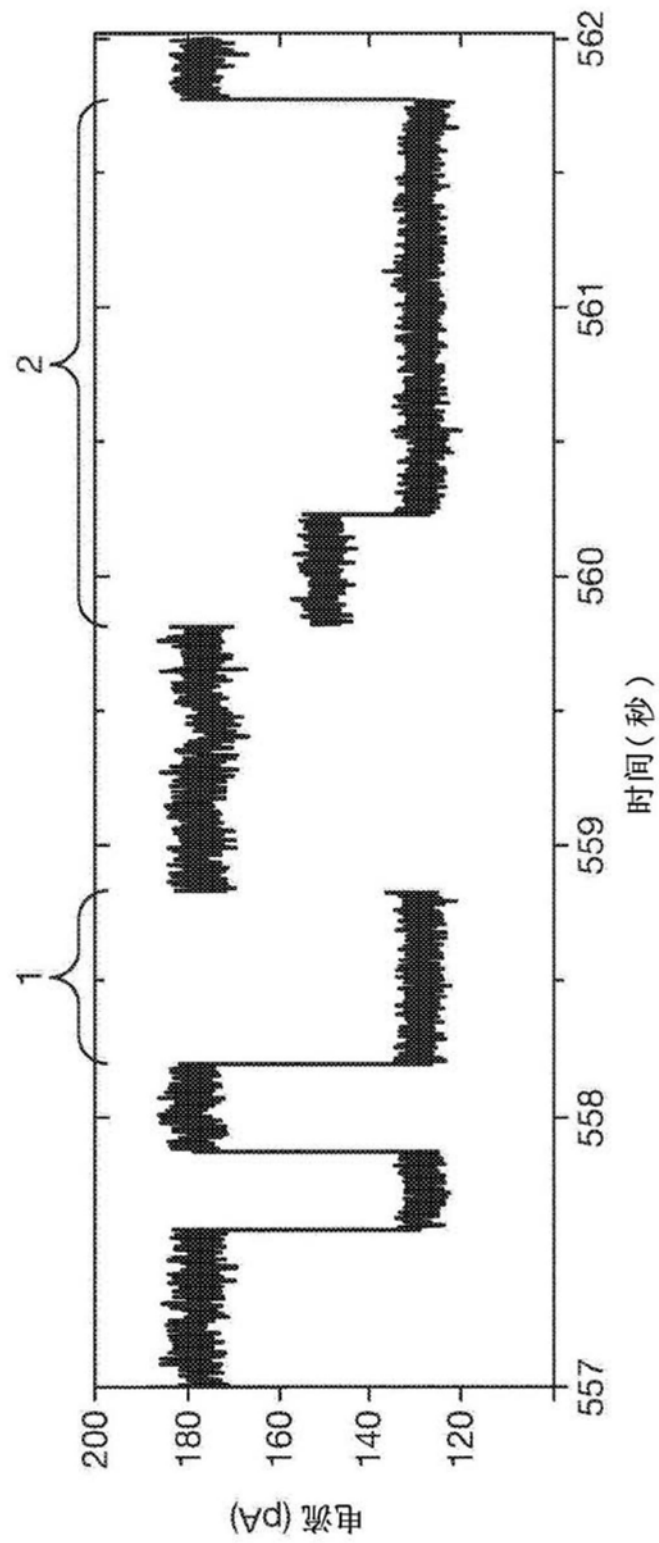


图49

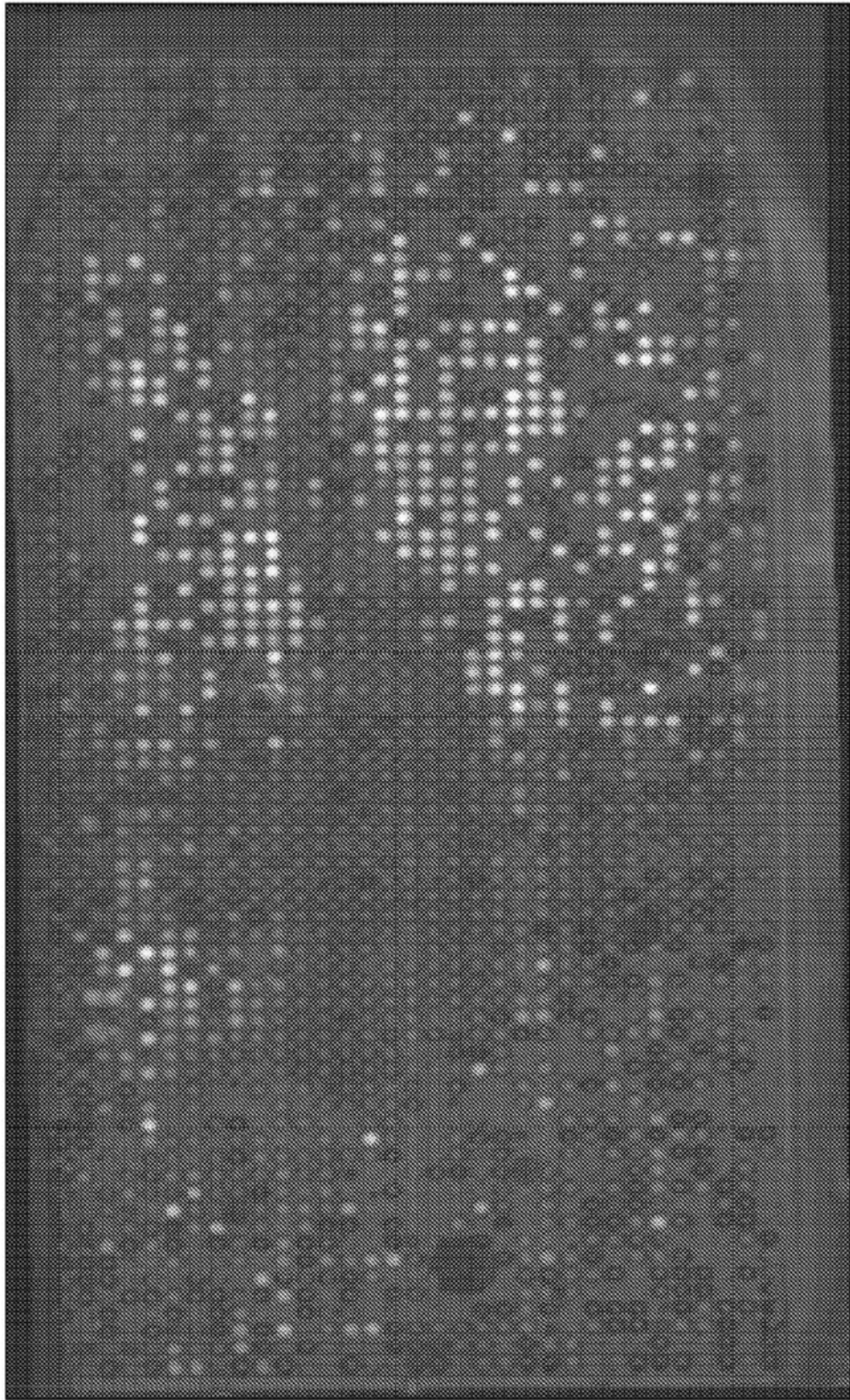


图50

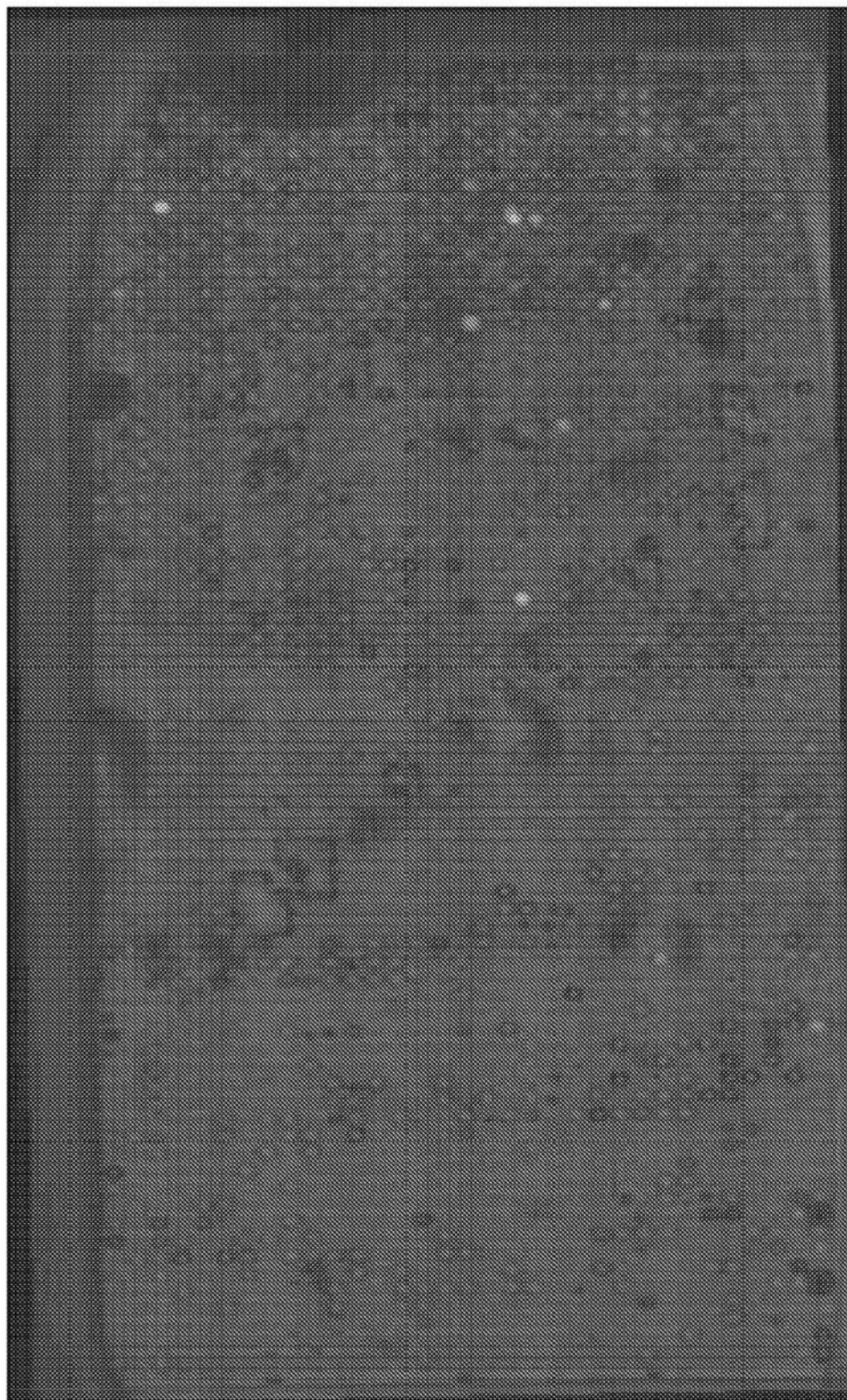


图51