(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101915957 B
(45)授权公告日 2012.12.12

(21)申请号 201010256535.7

(22)申请日 2007.06.11

(30)优先权数据
60/812,863 2006.06.12 US

(62)分案原申请数据
200780021826.4 2007.06.11

(73)专利权人 加利福尼亚太平洋生物科学公司
地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 M·福奎特 P·佩鲁索 S·特纳
D·B·罗伊特曼 G·奥托

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 李帆

(51)Int.Cl.
G02B 6/10(2006.01)
G01N 21/77(2006.01)

(56)对比文件
US 2005/0276535 A1,2005.12.15, 全文.
CN 1251609 A,2000.04.26, 全文.
US 2006/0060766 A1,2006.03.23, 全文.
K.T. Samiee et al.Zero Mode Waveguides for Single-Molecule Spectroscopy on Lipid Membranes.《Biophysical Journal》.2006, 第90卷(第9期),3288-3299.

审查员 张小丽

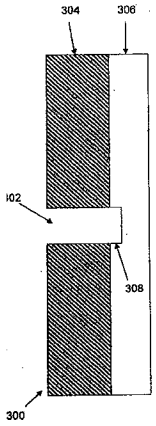
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 5 页

(54)发明名称

实施分析反应的基材

(57)摘要

本发明涉及一种实施分析反应的基材。该基材包括为提供附加功能元件而制造的零模式波导基材和/或包括增加的体积以定位活性表面的部件和/或减轻下方基材的负面电化学特性的部件。



CN 101915957 B

1. 零模式波导基材，包括：

透明基材层；

不透明包覆层；以及

芯部，其包含穿透该包覆层并至少部分延伸到该透明基材层内的孔。

2. 如权利要求 1 所述的零模式波导基材，其中该透明基材层包含至少第一透明层和第二透明层，第二透明层位于第一透明层之上，且该包覆层位于第二透明层之上，其中所述孔延伸穿透该包覆层和第二透明层。

3. 如权利要求 2 所述的零模式波导基材，其中该包覆层包含金属。

4. 如权利要求 1 所述的零模式波导基材，还包含活性表面，所述活性表面位于芯部内并且至少部分位于延伸到透明基材层内的部分芯部中。

5. 如权利更求 4 所述的零模式波导基材，其中该活性表面包含聚合酶。

6. 如权利要求 1 所述的零模式波导基材，其中该零模式波导基材包含零模式波导的阵列。

7. 如权利要求 1 所述的零模式波导基材，该零模式波导基材具有 10nm 至 250nm 的横截面尺度。

8. 如权利要求 1 所述的零模式波导基材，该零模式波导基材具有 20nm 至 100nm 的横截面尺度。

9. 监控反应的方法，该方法包括：

i. 在如权利要求 1 所述的零模式波导基材的芯部内提供反应混合物；和

ii. 监控该芯部的辐照体积内的反应混合物。

实施分析反应的基材

[0001] 本申请是优先权日为 2006 年 6 月 12 日且发明名称为“实施分析反应的基材”的中国发明专利申请 200780021826.4(国际申请号 PCT/US2007/070901) 的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请依据 35U.S.C. §119(e) 要求 2006 年 6 月 12 日提交的 U.S.S.N.60/812,863 的权利,在此明确地通过引用将其全部内容并入本文。

[0004] 关于联邦赞助研究的声明

[0005] 本发明的一部分是借助政府支持利用 NHGRI 拨款 No.R01-HG003710-01 做出的,并且政府对本发明享有一些权利。

[0006] 发明背景

[0007] 各种不同的科学学科在生物研究领域中的应用在生物体系表征和监控方面以及生物紊乱处理方面产生了巨大进展。特别地,固态电子学技术与生物研究应用的结合取得了很多重要进展,包括例如分子阵列技术,即 DNA 阵列(参见美国专利 No.6,261,776)、微流体芯片技术(参见美国专利 No.5,976,336)、化学敏感场效应晶体管 (ChemFET),以及其它有价值的传感器技术。

[0008] 零模式波导 (ZMW) 技术使这些半导体制造技术进一步扩展到研究和诊断的不同领域。特别地,ZMW 阵列用于一系列生物化学分析,并特别用于基因分析领域。ZMW 典型地包含位于透明基材上的不透明包覆层中的开口、井洞或纳米尺度芯部。由于芯部的狭窄尺度,因此将始终阻止频率高于特定截止频率的电磁辐射传播穿过该芯部。尽管如前所述,辐射将穿过有限距离而进入芯部,并在芯部内提供非常小的辐照体积。通过辐照非常小的体积,有可能访问 (interrogate) 极少量的反应物,包括例如单分子反应。

[0009] 通过在单分子水平监控反应,能够精确地识别和 / 或监控给定的反应。这是特别有前景的单分子 DNA 排序技术领域的基础,该技术通过单聚合酶 (polymerase enzyme) 以模板依赖方式进行 DNA 链的分子合成来监控分子。

[0010] 尽管取得了前述的进涉,然而仍存在很多另外的改进和进展。本发明提供了很多这样的改进和进展。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明一般针对于用于化学和生物化学分析的基材的配置和 / 或制造中的改进,且特别针对于在这样的基材中制造有光学特征的基材,例如零模式波导 (ZMW)。

[0013] 第一方面,本发明提供了一种零模式波导基材,所述基材包含具有至少第一表面的透明基材层,位于透明基材层的第一表面之上的金属包覆层和穿透该包覆层到达透明基材层的孔,并形成由金属包覆层包围的芯部区域,其中设定该芯部的尺度以阻止频率高于截止频率的电磁辐射传播穿透整个芯部。基材还包括位于包覆层上的牺牲阳极。

[0014] 相关联地,本发明提供了监控反应的方法,包括 :在包含金属包覆层的零模式波导的芯部中提供反应混合物,其中零模式波导包括牺牲阳极,并监控芯部的辐照体积内的反应混合物。

[0015] 另一方面,本发明提供了一种零模式波导基材,所述基材包含透明基材层、不透明

包覆层和芯部，包含穿透包覆层并至少部分延伸到透明基材层内的孔。

附图说明

[0016] 图 1 提供了位于基材上的零模式波导 (ZMW) 的示意性图解。

[0017] 图 2 提供了包括牺牲阳极层的 ZMW 的示意性图解。

[0018] 图 3 提供了包括在透明基材层内的增加体积区域的 ZMW 的示意性图解。

[0019] 图 4 提供了图 3 所示的 ZMW 的示例性制造过程。

[0020] 图 5 显示了制造图 3 所示的 ZMW 的替代性示例制造过程。

[0021] 图 6 为包括凹陷表面的 ZMW 的对比优势的示意性图解。

[0022] 发明详述

[0023] 本发明一般针对于用于化学和生物化学分析的基材的配置和 / 或制造中的改进，且特别针对于在这样的基材中制造有光学特征的基材，例如零模式波导 (ZMW)。

[0024] 在本发明的上下文中，分析基材一般包含刚性或半刚性固体基材，典型地在整个配置中基本是平面的，使用相关检测系统例如荧光显微镜、光学成像系统或电信号检测系统可以在该基材上进行并监控感兴趣的反应。典型地，这样的基材可具有制造于基材内或位于基材的表面上的附加功能部件。这样的部件包括例如分子部件，如分子连接部分，例如抗体、核酸非特异性化学偶联基团、结合肽等，或者性能改变基团例如疏水或亲水基团，以便在基材上提供相对疏水或亲水的区域。同样地，该基材可以具有制造于基材上或基材中的结构部件，包括例如屏障、井洞、柱体、柱状物、沟道、槽、电接触部、掩模层、包覆层等。

[0025] 根据本发明提供的特定解决方案的需要，本发明一般可以应用于一系列不同的基材类型。例如，第一方面，本发明提供了包含设置于其中的零模式波导 (ZMW) 阵列的基材。典型地，ZMW 的特征在于包围芯部部件的包覆部件，其中设定芯部的尺度，以使进入芯部中的电磁能量的频率低于特定阈值或截止频率，并被阻止完全传播穿透该芯部。结果，在芯部的这种电磁能量的方向仅在芯部的一部分内产生极小的辐照区域。在将芯部提供作为由包覆层界定的开放体积时，结果是在芯部内能够辐照极小的体积。能够辐射极小的体积，例如化学或生物化学反应物的体积，在很多应用中特别有价值。在美国专利 No. 6,917,726 中描述了这些 ZMW 阵列，及其制造和用途，出于所有目的将其整体并入本文。

[0026] 零模式波导典型地包括从约 10nm 到约 250nm 的横截面尺度，并优选具有从约 20nm 到约 100nm 的横截面尺度。ZMW 的横截面典型为圆形，然而其也可以具有狭长结构，例如椭圆、椭球、狭缝、凹槽或其它非圆形形状。本文讨论的零模式波导的芯部的深度典型地至少部分由包覆层的厚度限定，其厚度的典型范围从约 25nm 到约 500nm，且优选约 50nm 到约 200nm 的厚度。依据所需的应用，可以从可用深度的整个范围中选择所需的深度。

[0027] 通常将本发明的零模式波导制造在基材中，该基材包括沉积于透明基材上的透明基材层和不透明的包覆层。波导的芯部部分包含穿透包覆层到达透明层的孔，以限定具有开放的上端和被透明基材封闭的下端的井洞。图 1 显示了这样的波导的示意性图解。如图所示，整个基材 100 包括波导芯部 102，其位于不透明的包覆层 104 之内并且连续穿透至透明基材层 106。

[0028] 可以通过多种方法进行 ZMW 的制造。然而，在优选的方面，使用如下的分层制造策略 :在透明平面基材例如玻璃、熔结氧化硅、石英、氧化铝、透明聚合物等上提供薄金属膜。

通常如下进行芯部的界定：在透明基材上提供适当的抗蚀剂（resist）层并对抗蚀剂层进行显影以得到作为所需波导芯部的负像的柱状物或柱体。然后，将不透明膜例如薄金属膜或半导体膜层沉积在基材上以提供包覆层，并除去抗蚀剂柱状物以在其位置产生由包覆层包围的孔或芯部。典型金属包覆层包括可以使用常规金属沉积技术例如溅射和/或蒸发来制备的许多金属膜中的任何。这样的金属包括铝、金、铂、铬等及其组合，例如多层沉积物。半导体包覆层还可用于各种应用中，并包括例如可以使用例如气相沉积而沉积于基材上的各种 III-V 族、IV 族和/或 II-VI 族半导体中的任何。

[0029] 可以通过半导体制造领域已知的各种方法进行抗蚀剂柱状物的界定，包括例如光刻法、电子束平版印刷（e-beam lithography）技术，纳米压印平版印刷等。

[0030] 在至少第一方面，零模式波导的整体结构可以并入附加功能体（functionality），在优选情形中，该附加功能体作为附加层施加于整个基材。

[0031] 如上所述，优选的零模式波导包含位于透明基材材料上的金属包覆层。在将这样的金属化基材用于化学和/或生物化学操作时，基材将不可避免地暴露于可能略微损害金属的环境中，包括例如相对高盐浓度和/或非中性 pH 的环境，例如酸性或碱性条件。所有这些因素增加了这样的材料易于腐蚀的趋势。特别地，将这些金属部件暴露于高盐环境中可能产生电化腐蚀的机会。相应地，在至少一方面，本发明提供一种零模式波导基材，该基材包括作为基材部件的牺牲或电蚀（galvanic）阳极。这样的电蚀阳极可以是基材的一部分，例如作为一部分或作为分离层沉积在基材上，或可以将其作为独立部件添加到反应混合物中，例如作为颗粒、条带或丝线。可以使用各种不同金属中的任何作为电蚀阳极，包括例如锌、镁、铝、铁、镍、或可以充当下方包覆层金属的牺牲阳极的任何其它金属。应理解，最佳金属阳极层的选择可以在某种程度上取决于下方包覆层的构成（make-up）。另外，由于装置所暴露的环境会根据应用所需而变化，因此金属的还原电势将不同于它们的标准值。因此，多种材料可以用作牺牲阳极。对于具有半电池电势 X（在所用的条件下）的包覆层材料，以及具有半电池电势 Y 的阳极材料，若 Y 小于 X，则金属可以用作牺牲阳极。在某些情形中，包覆层材料或阳极材料或它们两者都将自发地改变至具有新的半电池电势 X’和 Y’的另一表面态，并且若 Y’小于 X’，则这些材料可以用作牺牲阳极。在牺牲阳极材料的性能中优选的材料包括：镁、锌、铍、镉、铀、铝、铟、锡、铅、铁、镍、铜、铬、钽和钨。在特别优选的方面，锌层与金属包覆层一起沉积或沉积于金属包覆层之上。可以使用各种金属膜沉积技术在包覆层上提供阳极层，包括溅射、蒸发、等离子体气相沉积等。

[0032] 在相关实施方案中，可以通过位于阳极层和包覆层之间的非导电层使附加层与包覆层电绝缘。在该实施方案中，可以直接对阳极层施加电势，由此去除阳极材科具有特定还原电势的限制。在该实施方案中，本发明提供与包覆层的电接触部，以及与阳极层的独立电接触部。可以在单独步骤中施加非导电层，或者其可以是待施加的其它材料之一的自然氧化物。例如，铝的自然氧化物是不导电的，并且本领域已知在导电铝层上形成氧化铝绝缘层的方法。

[0033] 在上述制造过程的情形中，一般可以将锌层与金属包覆层共沉积或作为后续层沉积在金属包覆层之上。一旦去除抗蚀剂柱状物，将穿透电蚀阳极和金属包覆层设置波导芯部。典型地，阳极层将为约 0.1nm 到约 100nm 厚，优选从约 1nm 到约 100nm 厚，从约 1nm 到约 50nm 厚，且在某些情形中从约 10nm 到约 50nm 厚。在图 2 中显示了根据本发明此方面的

波导基材的实施例。如图所示，并参考图 1，整个 ZMW 装置 200 同样包括位于包覆层 104 中的芯部 102，该芯部进而位于透明基材 106 的表面上。然而，除前述之外，牺牲阳极层 208 位于包覆层 104 的上表面上，并用于防止应用期间金属包覆层的过度电化腐蚀。

[0034] 在替代方面中，可以不按标准沉积工艺将分立的阳极部件添加到波导阵列。特别地，可以将合适的金属颗粒、条带等沉积于波导阵列上，只要其具有足够的尺寸例如足够大或足够小，以致不影响波导的功能，例如阻塞过多数目芯部的开口。

[0035] 在另一替代性的结构配置中，零模式波导在芯部的末端具有越过包覆层延伸到透明基材中的空间或体积。特别地，通过提供由芯部产生的体积的另外延伸，相比体积与芯部共同延伸的零模式波导（例如图 1 所示），可以获得很多优势。图 3 显示了具有这种替代性结构的波导的实施例。如图所示，零模式波导基材 300 包括穿透包覆层 304 的芯部 302 所述包覆层 304 沉积于透明基材 306 上。该波导结构还包括凹陷 308，该凹陷是芯部体积向透明基材 306 内的延伸或井洞，以增加整个波导结构的体积。特别地，在包括改性的表面（例如具有加工过的表面，该表面包括活性分子和 / 或连接分子和 / 或保护性的表面处理，即用以抑制非特异性表面缔合）的 ZMW 的情形中，还可以从下方基材表面进一步除去所得到的活性表面。因此，目标反应（例如在活性表面进行的反应）将落在 ZMW 的最佳观察体积的边缘或外部。因此，通过使下方基材表面凹陷，可以更好地将活性表面定位于观察体积内。图 6 中示意性地显示了该优势。

[0036] 在无凹陷的 ZMW 中，如图 6 的画面 I 所示。如图所示，ZMW 基材 600 包括位于包覆层 604 内穿透到透明基材层 606 的芯部 602。在 ZNMW 芯部 602 内提供由 Xs608 表示的活性表面，该活性表面例如用于执行所需的目标反应例如核酸聚合反应，并且该活性表面通过连接体分子 610 与下方基材 606 表面偶联。由于连接体 610 的尺寸以及可能的其它表面改性，活性表面 608 可能位于双察体积（由虚线 612 示出界限）的边缘或外部。然而，通过使下方基材的下表面凹陷，可以减弱这种潜在的问题。特别地，如图 6 中的画面 II 所示，ZMW620 在芯部 622 的底部包括凹陷下表面 624，使得活性表面 608 充分落在观察体积内。这特别提供了具有更易于调节的观察体积的零模式波导，例如超过单独包覆层厚度的可调性、对位于波导下方的光学体系 (optics) 的更高信号水平、产生改善的信噪比。

[0037] 除了前面所述的优势之外，检测区域体积的增大在统计检测体积内目标分子的占有率方面提供优势。在某些情况中，需要分析物在每个约束中均具有且仅具有一个被观察的分子。在包覆层的底部和装置的底面处于同一位置的情形中，该约束具有随着短的衰减长度指数递减的分布。结果是以下情况很罕见 :一个分子被定位在检测区而第二个分子不会存在于检测区之上，由此对第一分子造成背景噪声。通过降低底面，分布发生改变以模拟阶跃函数，其中装置的一部分位于检测区“内”，具有相对一致的观察效率，而装置的另一部分位于检测体积“外”，具有将两个区域分隔的非常快的指数衰减。在后一情形中，随机得到其中一个分子位于检测区内且没有分子位于指数衰减区内的配置的概率大大增加。由深井洞提供的相对一致性的附加优势是，单分子荧光输出的水平对位置的依赖性较小，因此，当由于将荧光团束缚于装置的柔性连接体而存在一些起伏自由度时，单分子荧光输出的水平在时间上更均匀。

[0038] 透明基材 306 中的凹陷或井洞 308 典型地具有与芯部相当的横截面尺度，例如直径，但也可以根据所需的应用和功能性而改变其深度。

[0039] 可以通过很多方法制造根据发明该方面的改进的零模式波导。例如，在第一优选方面，在沉积金属包覆层前，制造井洞作为 ZMW 制造中的附加沉积步骤。特别地，使用抗蚀剂柱状物的负像，将透明材料层（例如与下方透明基材具有相同或相似组成的材料）沉积于透明基材上。然后，将金属包覆层，和任选的任何附加层例如电蚀阳极层沉积于其上。一旦从结构中除去柱状物，就在包覆层中留下具有延伸到透明基材层内的额外体积的波导芯部。图 4 示意性地示出了该过程。

[0040] 如图 4 所示，提供具有上表面 402 的透明基材 400。然后，在表面 402 上沉积抗蚀剂层 404。对抗蚀剂进行曝光并显影以产生所需波导芯部的负像，如柱状体 406 所示。然后，在基材的曝光表面 402 上沉积附加透明材料层 408 以建立围绕柱状体 406 的透明基材层。透明材料在组成上优选与下方的透明基材 400 相同或相似。例如，在玻璃基材的情形中，可使用半导体制造领域中公知的各种技术中的任何技术在基材表面沉积 SiO_2 层，所述技术包括例如在玻璃上旋涂、等离子增强化学气相沉积、气相沉积硅随后氧化成 SiO_2（例如热氧化）。然后，在透明层 408 上沉积金属包覆层 410。然后，使用例如剥离 (lift-off) 或“敲离 (knock-off)”方法从整个基材除去抗蚀柱状体，产生位于包覆层中的波导结构的开放芯部 412。此外，芯部的体积延伸到附加透明层 408 中，以便向芯部提供附加的体积。

[0041] 在替代性的工艺中，波导芯部可以用作附加刻蚀步骤中的掩模层。特别地，使用上述工艺制造 ZMW。然后，金属包覆层充当后续刻蚀步骤的掩模层。在这种背景中，选择所用的刻蚀剂以及刻蚀时间以产生所需的刻蚀空间几何形状。例如，当使用各向异性反应离子刻蚀 (RIE) 刻蚀基材时，所得到的要素 (feature) 将具有竖直的侧壁且具有与包覆层中的开口相同的俯视图。在该情况中，现有技术中已知的方法为，以相对于包覆材料的良好选择度来刻蚀基材材料。在各向同性地进行刻蚀（使用湿法化学刻蚀或 RIE）的情形中，可以控制时间以避免导致刻蚀体积显著大于波导尺度。作为替代或补充，可以使用更加晶态的基材，例如石英等，其中刻蚀的各向异性程度更大而不论刻蚀条件如何，从而产生更受限制的刻蚀空间。作为替代，可以使用干法刻蚀技术。图 5 示意性地显示了该工艺。

[0042] 如图 5 所示，ZMW 基材 500 包括穿透位于透明基材 506 上的金属包覆层 504 的 ZMW 芯部 502，在本发明的该方面，透明基材包括无机材料，例如玻璃、石英或熔结氧化硅。根据本发明的该方面，包覆层兼任后续刻蚀步骤的掩模层。特别地，将基材暴露于适当的刻蚀剂（如箭头 508 所示）中，刻蚀剂在芯部体积中刻蚀出附加的深度，例如阴影区 508 和凹区 510 所示。在某些情形中，可能需要在包覆层中使用在平版印刷技术中更常规使用的金属，例如铬、金等，因为它们相比其它金属具有对较苛刻的刻蚀环境的更高容忍度，或者更好地充当掩膜材料，提供更高分辨率特征。

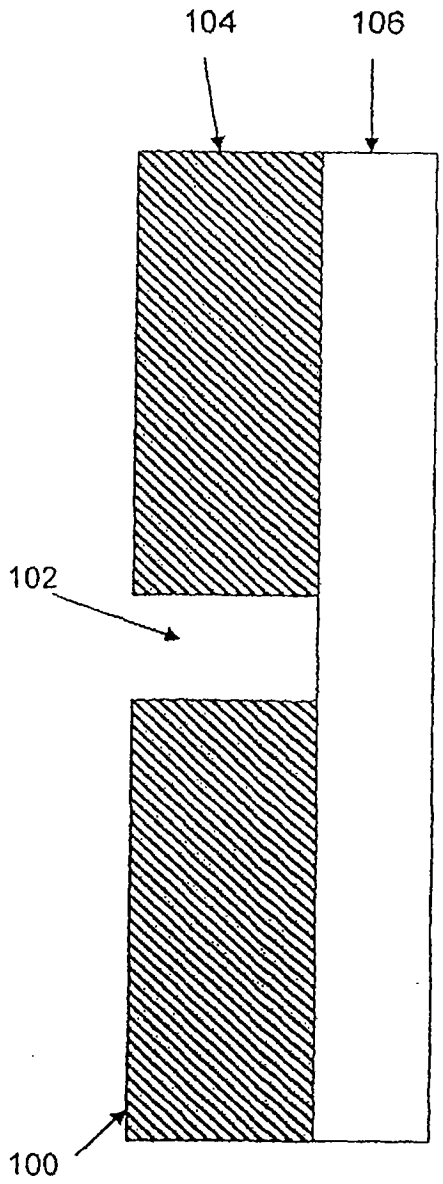


图 1

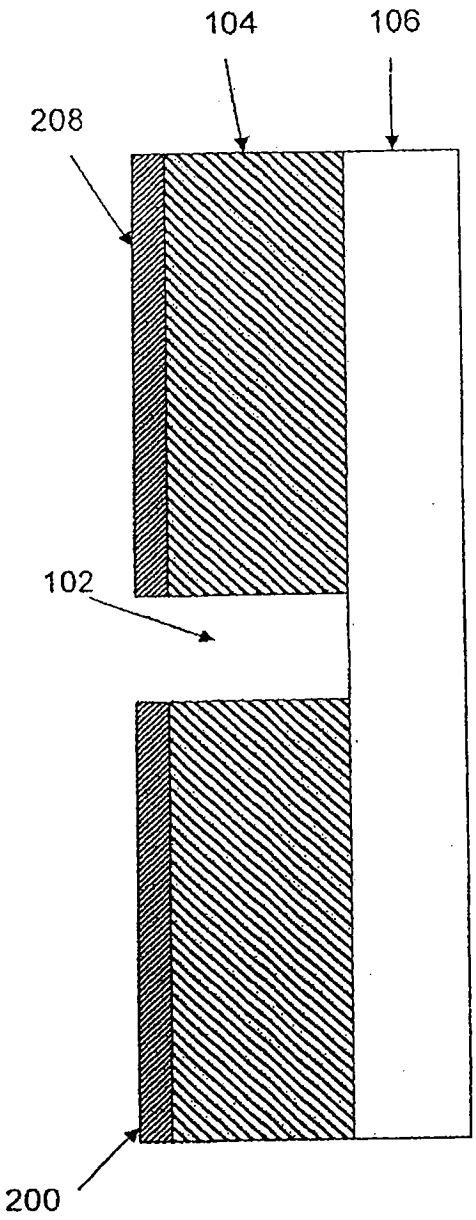


图 2

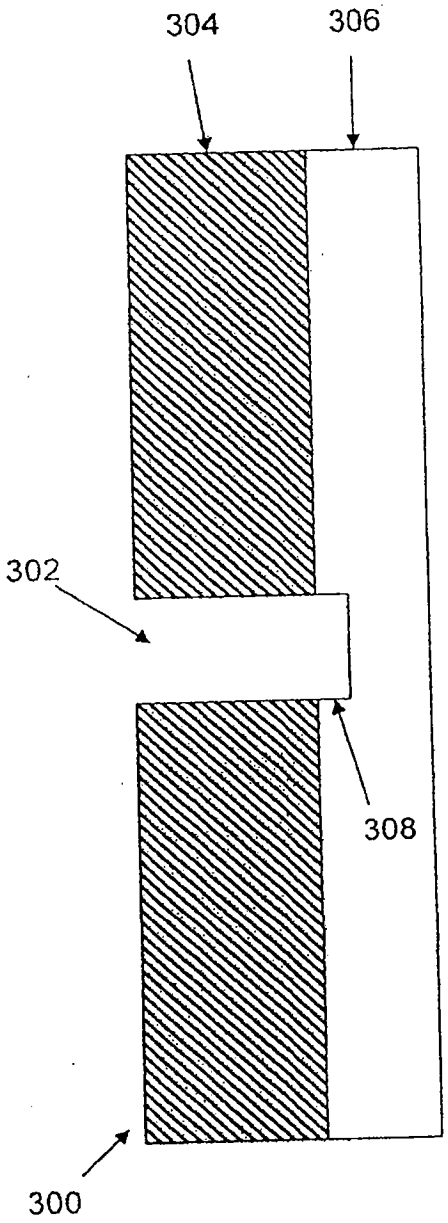


图 3

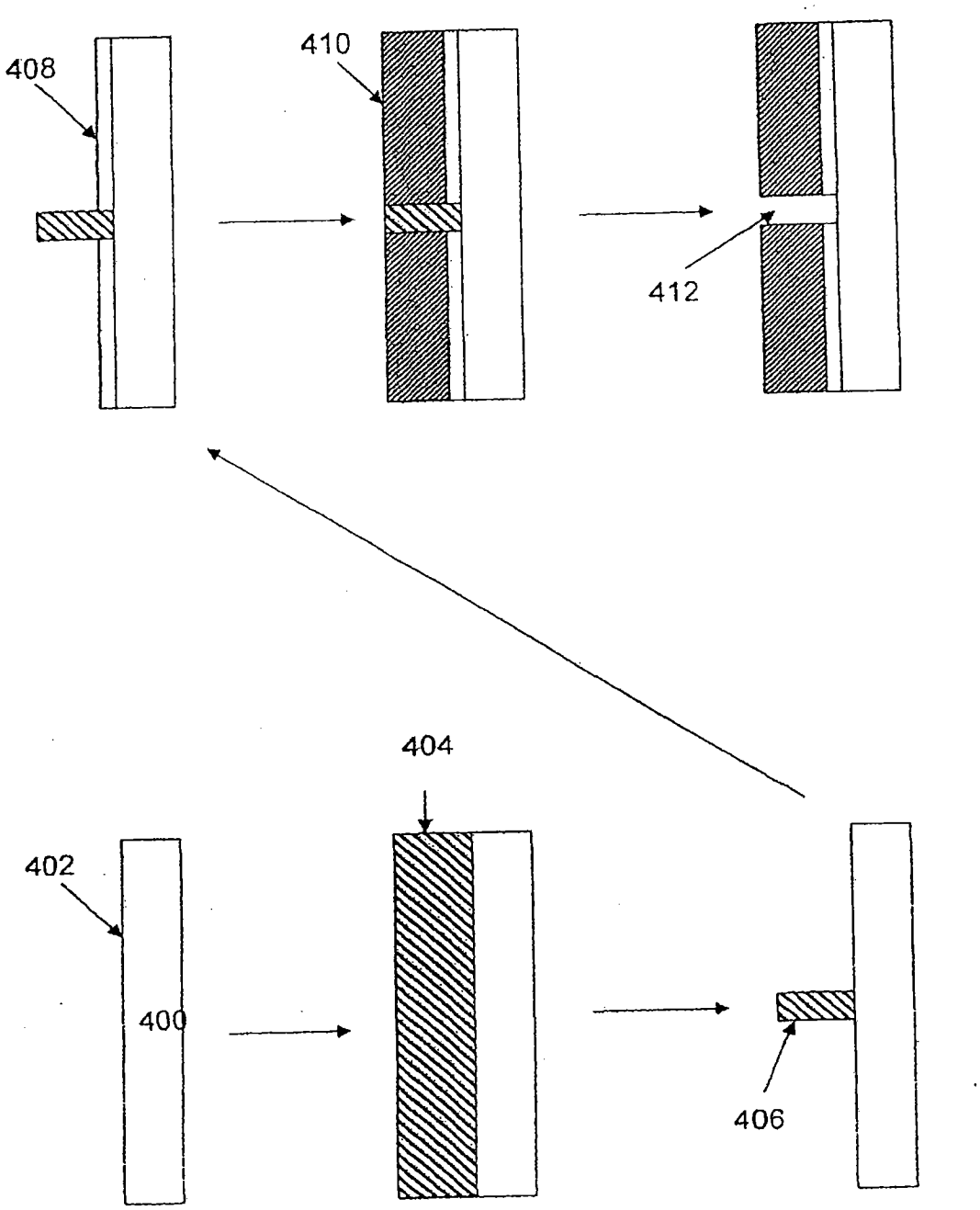


图 4

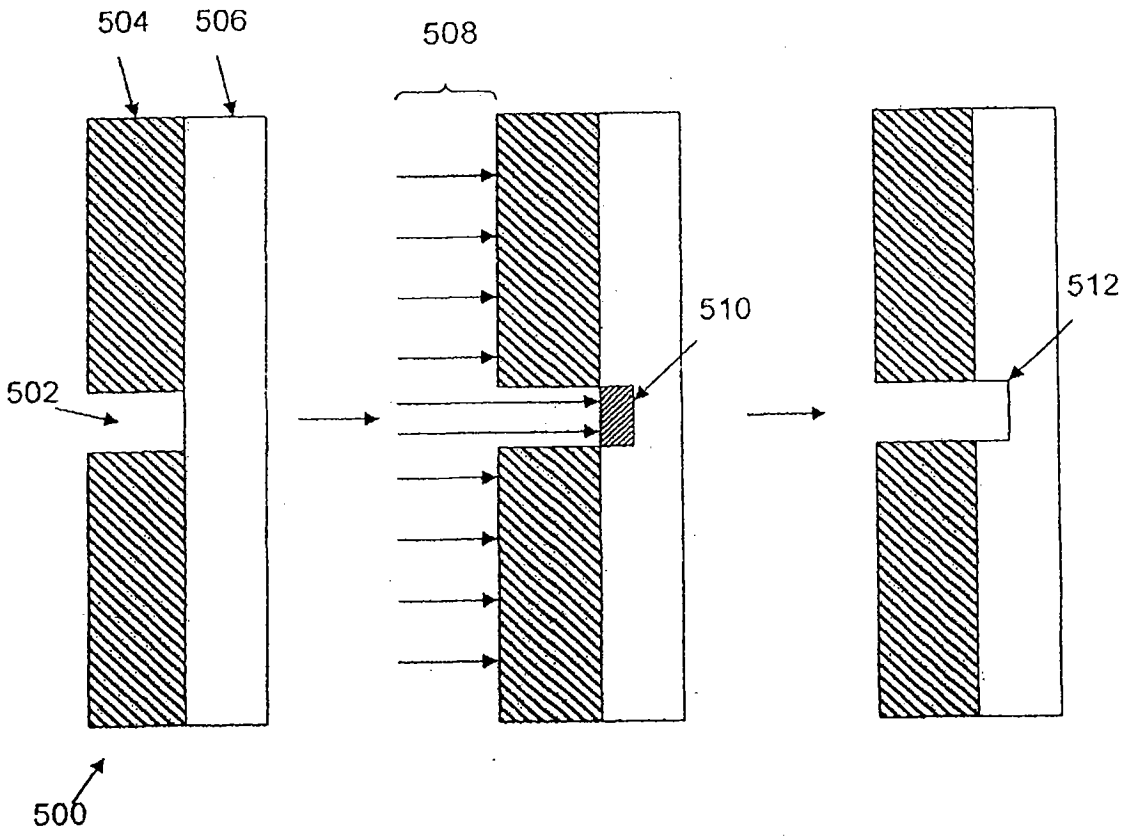


图 5

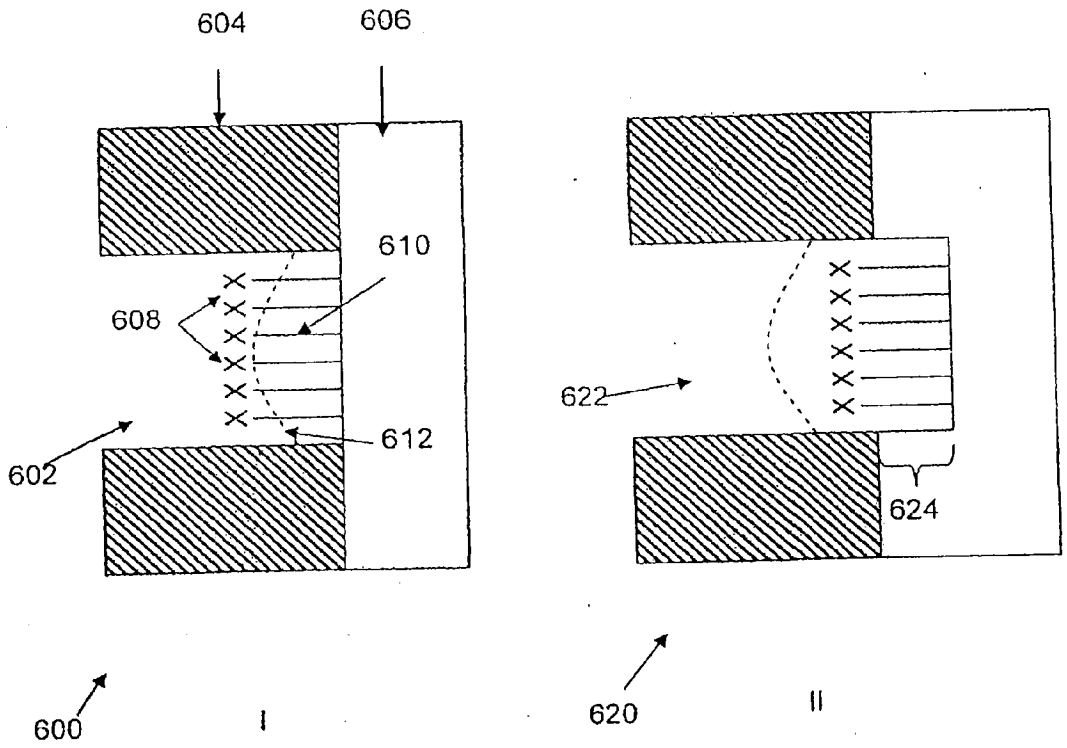


图 6