



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103203256 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201310054745. 1

B82Y 30/00(2011. 01)

(22) 申请日 2007. 07. 19

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/831, 772 2006. 07. 19 US

60/908, 582 2007. 03. 28 US

60/908, 584 2007. 03. 28 US

CN 1379857 A, 2002. 11. 13, 说明书第 1 页
6-9 行, 第 19 页 16 行 - 第 20 页 13 行以及第 24 页
5-14 行, 附图 1-23.

审查员 李欣

(62) 分案原申请数据

200780034694. 9 2007. 07. 19

(73) 专利权人 博纳基因技术有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 曹涵 帕里克希特·A·德什潘德

迈克尔·D·奥斯汀

迈克尔·博伊斯-亚契诺

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 谢丽娜

(51) Int. Cl.

B01L 3/00(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C12M 1/34(2006. 01)

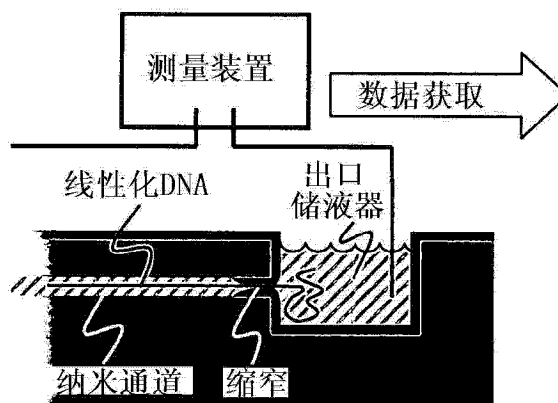
权利要求书2页 说明书12页 附图6页

(54) 发明名称

纳米口装置阵列: 它们的制备以及在大分子
分析中的应用

(57) 摘要

本发明公开了纳米口装置阵列: 它们的制备
以及在大分子分析中的应用。具体地, 本发明公开
了缩窄的纳米通道装置, 适合用于分析大分子结
构, 包括 DNA 测序。还公开了制造这样的装置以及
使用这样的装置分析大分子的方法。



1. 表征大分子的一种或多种特征的方法,包括:
使至少一部分位于纳米通道内的大分子线性化,
至少一部分纳米通道能够物理制约大分子的至少一部分,以便大分子的该部分维持在线性形式,并且
纳米通道含有至少一个缩窄,其有效内径基本上小于纳米通道的有效内径,且其中纳米通道的有效内径在 10nm 和 500nm 之间且纳米通道的长度至少 500nm;
将大分子的至少一部分在纳米通道的至少一部分内运送,使得大分子的至少一部分通过所述缩窄;
监测至少一个与大分子通过所述缩窄相关联而产生的信号;以及
将所述至少一个信号与大分子的一种或多种特征联系起来。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述运送包括将大分子暴露于梯度。
3. 权利要求 1 的方法,其中信号包括视觉信号、红外信号、紫外信号、放射性信号、磁信号、电信号、电磁信号或其任何组合。
4. 权利要求 1 的方法,其中大分子含有一种或多种标记物。
5. 分析线性化大分子的装置,包含:
两个或多个流体储液器;以及
含有缩窄的纳米通道,所述缩窄的有效内径基本上小于纳米通道的内径,
纳米通道使至少两个流体储液器彼此之间流体连通,以及
纳米通道的至少一部分或缩窄的至少一部分能够物理制约大分子的至少一部分,以便大分子的该部分维持基本线性的形式,其中纳米通道的内部有效直径在 10nm 到 500nm 之间且其长度至少 500nm。
6. 权利要求 5 的装置,其中所述缩窄包含的有效内径为 0.5nm 到 100nm。
7. 权利要求 5 的装置,还包含梯度发生器。
8. 权利要求 5 的装置,还包括检测器,能够检测由线性化大分子的至少一部分通过缩窄而产生的信号。
9. 运送大分子的方法,包括:
提供至少两个流体储液器;
提供至少部分线性化的大分子,
大分子的至少一部分位于纳米通道中,
纳米通道使至少两个流体储液器彼此之间流体连通,
纳米通道含有缩窄,所述缩窄的有效内径基本上小于纳米通道的有效内径,其中纳米通道的有效内径在 10nm 和 500nm 之间且其长度至少 500nm;以及
对大分子施加梯度,
梯度导致线性化的大分子的至少一部分在纳米通道的至少一部分内被运送。
10. 制造缩窄的纳米通道的方法,包括
提供纳米通道
纳米通道的内径为 10nm 到 500nm,并且
纳米通道的长度为至少 500nm;
在纳米通道内的位置处、邻近纳米通道末端的位置处、或这两个位置处减小纳米通道

的内径,以致在纳米通道内或邻近产生缩窄,其中所述缩窄的有效内径基本上小于纳米通道的有效内径且与纳米通道流体连通,

该纳米通道能够将线性化的大分子维持在其线性化形式,并且
减小的内径能够允许线性化大分子的至少一部分通过。

11. 权利要求 10 的方法,其中纳米通道的内径通过将一种或多种材料附加沉积在纳米通道内或外部来减小。

12. 权利要求 10 的方法,其中影响纳米通道的内径包括下述步骤:(a) 将牺牲材料放置在纳米通道内,(b) 将附加材料沉积到牺牲材料附近以便完全堵塞纳米通道,以及(c) 选择性去除至少一部分牺牲材料,以便在除去的牺牲材料的维度上产生减小的纳米通道内径。

13. 用于大分子线性化的方法,包括:

将大分子放置在纳米通道中,其中纳米通道的有效内径在 10nm 和 500nm 之间且其长度至少 500nm,

其中纳米通道包含缩窄,缩窄的有效内径基本上小于纳米通道的有效内径,以及
纳米通道的至少一部分能够物理制约大分子的至少一部分,以便将大分子的该部分维持在线性形式。

14. 权利要求 1,9,10 和 13 任一项的方法,其中所述缩窄位于纳米通道内或在纳米通道的末端。

15. 权利要求 1,9,10 和 13 任一项的方法,其中所述缩窄的有效内径在 10nm 到 100nm 之间。

16. 权利要求 5 的装置,其中所述缩窄位于纳米通道内或在纳米通道的末端。

17. 权利要求 5 的装置,其中所述缩窄的有效内径在 10nm 到 100nm 之间。

纳米孔装置阵列：它们的制备以及在大分子分析中的应用

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 7 月 19 日、中国国家申请号为 200780034694.9、发明名称为“纳米孔装置阵列：它们的制备以及在大分子分析中的应用”申请的分案申请。

[0002] 与相关申请的交互参考

[0003] 本申请要求 2006 年 7 月 19 日提交的美国临时申请 No. 60/831,772、2007 年 3 月 28 日提交的美国临时申请 No. 60/908,582 和 2007 年 3 月 28 日提交的美国临时申请 No. 60/908,584 的利益，这些临时申请的全部内容在此引为参考。

发明领域

[0004] 本发明属于纳米级装置领域。本发明还属于大分子测序领域，特别是 DNA 测序和表征的领域。

[0005] 发明背景

[0006] 本文引用了各种不同的科学和专利出版物。每个都以其全文引为参考。

[0007] 生物分子例如 DNA 或 RNA 是由核苷酸组成的长分子，其序列与生物体的基因组以及后基因组基因表达信息直接相关。在大多数情况下，在个体的寿命期间，核苷酸序列的突变或重排能导致病态，例如遗传异常或细胞恶变。在其它情况下，每个个体之间少量的序列差异反映了群体遗传组成的多样性。由于遗传序列中的这些差异，某些个体对环境刺激和信号、包括药物治疗有不同的反应。例如，某些患者对某些化合物经历阳性反应，而其它患者则没有作用甚或是不良副作用。

[0008] 研究遗传多样性和医学药理学关联的群体基因组学、医学基因组学和药物基因组学领域需要广泛的测序覆盖面和大样品数。产生的测序知识对于卫生护理和制药工业来说将是特别有价值的。癌症基因组学和诊断学研究了导致肿瘤发生的基因组不稳定事件。所有这些领域，将从能够快速测定生物聚合物分子例如核酸的线性序列、或生物聚合物上的表观遗传生物标志物例如甲基化模式的技术中获益。长期以来，感到需要使用非常少量的样品、甚至到单个细胞。这将极大地增进监测细胞状态和了解疾病的发生和进展的能力，例如癌症细胞的恶性阶段。

[0009] 大多数基因组或表观基因组分析技术对于普遍分析大群体的大基因组区域来说，仍然过于昂贵。为了实现将基因组分析成本降低至少 4 个数量级的目标，即所谓的“1000 美元基因组”里程碑，需要用于分子分析方法的新技术。参见 Nicholas Wade 在 2006 年 7 月 18 日的《纽约时报》(The New York Times) 上的“寻求 1000 美元人类基因组”。

[0010] 一种为了快速测序而开发的技术涉及使用纳米级孔，DNA 从其中穿过。在历史上，“纳米孔”概念使用了生物分子装置，当 RNA 或 DNA 链被施加的电压驱动通过孔时，产生离子电流信号。但是，生物系统对 pH、温度和电场敏感。此外，生物分子不容易用敏感片上电子(sensitive on-chip electronics)所要求的半导体工艺集成。

[0011] 许多工作因此聚焦于在固态材料中设计和构造人造纳米孔。但是，这些方法只能在膜上产生孔，而不能产生实现长生物聚合物例如 DNA 或 RNA 的真正单分子测序所需的较长通道。

[0012] 因此,在本领域中需要能够获得长生物聚合物例如 DNA 或 RNA 的序列和其它信息的装置。

[0013] 发明概述

[0014] 在遇到所述难题时,本发明的第一个方面提供了表征大分子的一个或多个特点的方法,包括使至少一部分位于纳米通道内的大分子线性化,至少一部分纳米通道能够物理上制约大分子的至少一部分,使得大分子的该部分维持线性形式,并且纳米通道含有至少一个缩窄;将大分子的至少一部分在纳米通道的至少一部分中运送,使得大分子的至少一部分通过该缩窄;监测至少一个与大分子通过该缩窄相关联产生的信号;以及将至少一个信号与大分子的一种或多种特点联系起来。

[0015] 第二个方面中,本发明提供了分析线性化大分子的装置,包括两个或多个流体储液器;以及含有缩窄的纳米通道,该纳米通道使至少两个流体储液器彼此之间流体连通。

[0016] 还提供了运送大分子的方法,包括提供至少两个流体储液器;提供至少部分线性化的大分子,大分子的至少一部分位于纳米通道中,纳米通道使至少两个流体储液器彼此之间流体连通,纳米通道含有缩窄;以及对大分子施加梯度,该梯度导致线性化大分子的至少一部分在纳米通道的至少一部分中运送。

[0017] 此外还提供了制造缩窄的纳米通道的方法,包括提供纳米通道;纳米通道的内径为大约 0.5nm 到大约 1000nm,纳米通道的长度为至少大约 10nm;在纳米通道内的位置处、邻近纳米通道末端的位置处、或这两个位置上减小纳米通道的内径,以致在纳米通道内或附近产生缩窄,缩窄的内径与纳米通道流体连通,纳米通道能够将线性化大分子维持在其线性化形式,并且减小的内径能够允许线性化大分子的至少一部分通过。

[0018] 还公开了使大分子线性化的方法,包括将大分子放置在纳米通道中,纳米通道的至少一部分能够物理上制约大分子的至少一部分,以便将大分子的该部分维持在线性形式。

[0019] 该一般性叙述和下面的详细描述仅仅是示例性和解释性的,并非对所附权利要求书所限定的本发明进行限制。由于本文所提供的本发明的详细描述,本发明的其它方面对于本技术领域的专业人员来说将是显而易见的。

[0020] 附图简述

[0021] 在结合附图一起理解时,概述以及下面的详细描述将得到进一步理解。出于图解本发明的目的,在图中显示了本发明的示例性实施方案;但是,本发明不限于所公开的具体方法、组成和装置。此外,图不一定是按比例绘制的。在图中:

[0022] 图 1a 是 DNA 测序仪的示意图,显示了线性化的双链 DNA 通过纳米通道进入出口储液器中,在此测量装置检测出口储液器中或纳米通道内与 DNA 通过相关的物理、化学、电学或其它变化;

[0023] 图 1b 描绘了 DNA 分子流过位于纳米通道末端的纳米口(nanonozzle)缩窄;

[0024] 图 1c 描绘了由 DNA 通过缩窄的纳米通道产生的数据;

[0025] 图 2a 是 DNA 测序仪的示意图,显示了线性化的单链 DNA 通过纳米通道进入出口储液器中,在此测量装置检测出口储液器中或纳米通道内与 DNA 通过相关的物理、化学、电学或其它变化;

[0026] 图 2b 描绘了单链 DNA 分子流过位于纳米通道末端的纳米口缩窄;

[0027] 图 2c 描绘了当单链 DNA 的个体核苷酸通过纳米通道的缩窄时产生的数据；

[0028] 图 3a 是 DNA 测序仪的示意图，显示了线性化、甲基化的双链 DNA 通过纳米通道进入出口储液器中，在此测量装置检测出口储液器中或纳米通道内与 DNA 通过相关的任何物理、化学、电学或其它变化；

[0029] 图 3b 描绘了甲基化的双链 DNA 分子流过位于纳米通道末端的纳米口缩窄；

[0030] 图 3c 描绘了当甲基化双链 DNA 的个体核苷酸通过纳米通道的缩窄时产生的数据；

[0031] 图 4 描绘了与储液器连通的封闭的纳米通道的代表性实施方案，纳米通道所具有的缩窄的横截面积小于纳米通道的其余部分，大分子在纳米通道内被线性化，当分子通过缩窄时，分子上的目标特征得以检测；

[0032] 图 5 描绘了密封的的纳米通道与第二个纳米通道通过横截面积比两个纳米通道都要小的缩窄相连通，大分子在纳米通道内被线性化，当分子通过缩窄时，分子上的目标特征得以检测；

[0033] 图 6a 描绘了通过附加材料的沉积在纳米通道的末端制备缩窄，图 6b 是这种缩窄位于纳米通道末端的实施方案的扫描电子显微照片；

[0034] 图 7 描绘了位于纳米通道末端的缩窄的代表性制作，(图 7a)通过将材料沉积在纳米通道的末端，导致通道的完全封闭；(图 7b)使用酸性蚀刻剂并通过暴露于中和性强碱来终止，自接通(self-terminating)缩窄的开口；以及(图 7c)除去蚀刻剂和中和剂之后的最终纳米口装置；

[0035] 图 8 描绘了使用牺牲材料，纳米通道末端的缩窄的代表性制作：(图 8a)将牺牲大分子放置在纳米通道中，令其部分出到储液器中；(图 8b)除去流体，将材料沉积在牺牲分子周围；以及(图 8c)除去牺牲分子，在纳米通道的末端留下缩窄；以及

[0036] 图 9 显示了一系列 3 张扫描电子显微照片，描述了使用材料的附加沉积，通道尺寸逐渐减小：(图 9a)在起始宽度和高度为大约 150nm 的开口纳米通道上，附加沉积氧化硅，产生了直径为大约 50nm 的封闭纳米通道，(图 9b)沉积参数变化产生较小的封闭通道，以及(图 9c)通过延伸，能够生成小于 10nm 的开口。

[0037] 说明性实施方案的详细描述

[0038] 术语

[0039] 本文中使用的术语“基本上线性”是指长分子——例如但不限于含有 200 个连接在一起的核酸的多核酸——的至少一部分的构象，没有自身环回或不包含任何大于大约 360 度的锐弯或锐曲。

[0040] 本文使用的术语“纳米通道”是指具有至少一个纳米级维度的导管、通道、管、管道或其它的类似结构。

[0041] 通过参考下面构成本公开一部分的详细描述结合附图和实施例，本发明可以更容易被理解。要了解，本发明不限于本文描述和 / 或显示的具体装置、方法、应用、条件或参数，并且本文使用的术语仅仅是出于描述具体实施方案作为示例的目的，并不旨在限制要求权利的本发明。此外，当用于说明书包括所附的权利要求书中时，单数形式的“a”、“an”和“the”包括复数，并且对具体数值的指称至少包括该具体值，除非上下文明确地另有说明。本文使用的术语“复数”是指多于一个。当表达数值范围时，另一个实施方案包括从一个具

体值和 / 或到另一个具体值。同样地,当通过使用先行词“大约”将值表示为近似值时,应该理解,该具体值构成了另一个实施方案。所有的范围都是包含端点的和可以组合的。

[0042] 应该认识到,本发明的某些特征为了清楚起见,在本文中描述在分开的实施方案的背景下,但也可以在单个实施方案中组合提供。相反,本发明的各种不同的特征为了简捷起见,被描述在单个实施方案的背景下,但是也可以分开或以任何亚组合提供。此外,提及以范围陈述的值则包括该范围内的每个和所有的值。

[0043] 一方面,本发明提供了表征大分子的一种或多种的方法。这些方法包括使至少一部分位于纳米通道内的大分子线性化,至少一部分纳米通道能够物理上制约大分子的至少一部分,使得大分子的该部分维持在线性形式。

[0044] 适合的纳米通道的直径小于大分子在其伸展形式下回转半径的大约两倍。已知这样维度的纳米通道开始执行对自由伸展的、波动性大分子螺旋的熵限制,以便伸展和延长螺旋。适合的纳米通道可以按照 2004 年 1 月 20 日提交的美国专利申请 No. 10/484, 293, “纳米通道阵列及其制备以及在高通量大分子分析中的应用”(Nanochannel Arrays And Their Preparation And Use For High-Throughput Macromolecular Analysis)中描述的方法来制备,其全文在此引为参考。

[0045] 适合的纳米通道包括至少一个缩窄。这样的缩窄的功能是局部降低纳米通道的有效内径。缩窄可以定大小,以便允许线性化大分子通过。

[0046] 所述方法还包括将大分子的至少一部分在纳米通道的至少一部分中运送的步骤,使得大分子的至少一部分通过所述缩窄。这显示在例如图 1b、2b 和 3b 中,其中显示 DNA 通过纳米通道的缩窄。缩窄可以如下制造:例如,通过将材料沉积在纳米通道的末端以密封纳米通道,然后蚀刻掉一部分沉积的材料,直到产生比纳米通道窄得多的孔。这被进一步图解在图 6 到 9 中。

[0047] 在要对相当长的大分子进行分析时,大分子的末端被传递到纳米通道的一个末端中。这是通过例如梯度结构来实现的,梯度结构协助这种向纳米通道中的传递;适合的梯度结构描述在 Cao 等的美国专利 No. 7, 217, 562 中。

[0048] 所述方法还包括监测至少一个与大分子通过缩窄相关联而产生的信号;以及将该至少一个信号与大分子的一种或多种特征联系起来。这绘制在图 1a、2a 和 3a 中,其描绘了监测与大分子通过纳米通道中的缩窄相关联而产生的信号的示意图。适合的信号包括例如电荷信号、光学信号、电磁信号、磁信号或其任何组合。电信号可以使用,例如,各种不同的可商购电流计和放大器中的任何一种来监测。例如,适合的信号监测设备能够在与储液器和纳米通道区段中的液体接触的电极上施加恒定的电压,其范围从大约纳伏、或微伏、或毫伏甚或伏特或更高。适合的监测设备还能够每秒测量电极之间的电流很多次。适合的设备将具有至少大约 100 赫兹(“Hz”,每秒周期数)、或大约 1 千赫兹(“kHz”)、或大约 10kHz、或大约 100kHz、或大约 1 兆赫兹(“MHz”)甚或大约 10 兆赫兹的带宽。因此,一旦测量是在纳秒、或毫秒、或甚至微秒级上的变量,就可以得出电流。电流幅值可以从皮秒……。通过典型的“膜片钳放大器”,sDNA 的迁移速度为大约每微秒 40 个碱基。目前最好的机器能够每微秒取样一次。Axopatch200B 分子装置(www.moleculardevices.com),具有 100kHz 的带宽,能够每秒 100,000 次电流测量,或相当于每次电流测量是连接到两个废液储液器的电极间 10 微秒的电流改变。

[0049] 适合本方法的大分子包括多核苷酸、多核苷、天然和合成的聚合物、天然和合成的共聚物、树状聚体、表面活性剂、脂类、天然和合成的碳水化合物、天然和合成的多肽、天然和合成的蛋白、或其任何组合。DNA 被认为是能够按照本文别处讨论的方法进行分析的特别适合的大分子。

[0050] 按照本文提供的方法分析的大分子通常存在于流体中。适合的流体包括水、缓冲液、细胞培养基等。适合的流体也可以是电解质的、酸性的或碱性的。

[0051] 大分子的运送是通过将大分子暴露于梯度来实现的，梯度沿着适合的纳米通道的流动方向适当施加。适合的梯度包括电渗场、电泳场、毛细流、磁场、电场、放射场、机械力、电渗力、电泳力、电动力、温度梯度、压力梯度、表面性质梯度、疏水性梯度、毛细流或其任何组合。电场是特别适合的温度。

[0052] 梯度可以是时间上恒定的、空间上恒定的、或其任何组合。梯度也可以按照需要在空间和时间上变化。在某些实施方案中，改变梯度能够在正向和反向上均运送大分子。在某些实施方案中，改变梯度允许大分子的同样部分多次通过缩窄。

[0053] 改变梯度也能够使用户让大分子快速前进通过缩窄，直到到达大分子上特定的目标区域，这种方式类似于将盒式磁带快进到所需的选定段。一旦到达目标区域，梯度可以改变，以便以较低的速度使目标区域通过缩窄。梯度也可以被逆转，以实现大分子通过缩窄的反向移动。这类似于将盒式磁带返回到所需位置。因此，通过控制储液器之间梯度的量级和极性，可以产生“播放”、“快进”、“返回”、“暂停”和“停止”功能。

[0054] 可以被检测的适合信号包括视觉信号、红外信号、紫外信号、放射性信号、磁信号、电信号、电磁信号或其任何组合。电信号被认为是优选的，原因是它们容易监测，但是其它信号也可以被有效监测。

[0055] 大分子可以包括一种或多种标记物；适合的标记物包括电子自旋共振分子、荧光分子、化学发光分子、同位素、放射性同位素、酶底物、生物素分子、亲和素分子、电荷转移分子、半导体纳米晶体、半导体纳米颗粒、胶体金纳米晶体、配体、微珠、磁珠、顺磁粒子、量子点、生色底物、亲和性分子、蛋白、肽、核酸、碳水化合物、抗原、半抗原、抗体、抗体片段、脂类、聚合物、带电荷颗粒、修饰的核苷酸、化学官能团、化学部分、或其任何组合。在某些实施方案中，标记物是化学部分例如甲基基团。这以非限制性的方式显示在图 3b 中，其描绘了用几个甲基基团标记的 DNA 链，这些甲基基团的检测作为标记 DNA 上存在一种或多种具体特征的指示。

[0056] 在某些实施方案中，信号是大分子固有发出的。这种固有发出的信号包括磁信号或放射信号，其中大分子或大分子的部分是磁性或放射性的。在信号是大分子固有发出的情况下，照射大分子以致引发可检测的信号并非还是必要的。

[0057] 在其它实施方案中，信号通过照射分子而产生。照射包括将大分子的至少一部分暴露于可见光、紫外光、红外光、X-射线、 γ -射线、电磁辐射、无线电波、放射性粒子或其任何组合下。适合的照射装置包括相干的和非相干的光源，它们可以照射、激发大分子或甚至可以从大分子散射。可以使用 UV、VIS、IR 光源，例如激光或其它光表面。

[0058] 通过本公开的方法检测的大分子的特征包括大分子的大小、大分子的分子组成、大分子的分子序列、大分子的一个或多个分子的电学性质、大分子的一个或多个分子的化学性质、大分子的一个或多个分子的放射性质、大分子的一个或多个分子的磁性质、或其任

何组合。

[0059] 正如本文别处所讨论,在某些实施方案中,大分子是标记的。因此,这样的大分子的特征是大分子的一个或多个标记物的位置。

[0060] 分子的分子组成也由本方法表征。分子组成包括大分子的一个或多个分子的位置、DNA 多态性、DNA 拷贝数多态性、DNA 内扩增、DNA 内缺失、DNA 内易位、DNA 内特定基因座的倒位、大分子内甲基基团的位置、或其任何组合。在某些实施方案中,多态性通过观察只与该多态性互补的标记探针的存在来检测。

[0061] 药物与大分子之间的结合位点、大分子-药物复合物、DNA 修复位点、DNA 结合位点、DNA 切割位点、siRNA 结合位点、反义结合位点、转录因子结合位点、调控因子结合位点、限制性酶结合位点、限制性酶切位点、或其任何组合的检测,都包含在本发明内。

[0062] 正如本文别处所讨论,这些特征通过质询大分子存在一个或多个与目标特征互补的探针来确定。该方法被示意性显示在图 1c、2c 和 3c 中,每张图都描绘了监测与大分子通过纳米通道缩窄相关联而产生的信号。在某些实施方案中,使用了两个或多个探针来确定给定大分子的两个或多个特征。

[0063] 装置的某些实施方案包括多个纳米通道。纳米通道这样的阵列用于有效表征单个大分子的多种特征或多个大分子的多种特征。对于本技术领域的普通专业人员来说,显而易见的是能够选择与某些特征互补的标记物,然后施加于给定大分子,然后对大分子进行表征以确定这些特征是否存在于该给定大分子上。

[0064] 还公开了分析线性化大分子的装置。适合的装置包括两个或多个流体储液器和含有缩窄的纳米通道,并且所述纳米通道使至少两个流体储液器彼此之间流体连通。正如本文别处所讨论,适合的纳米通道能够物理制约大分子的至少一部分,以致将该部分维持在线性形式。这更详细地陈述于 2006 年 7 月 19 日提交的美国申请 No. 60/831,772、2007 年 3 月 28 日提交的美国申请 No. 60/908,582 以及 2007 年 3 月 28 日提交的美国申请 No. 60/908,584 中,每个上述专利申请的全部内容在此引为参考。带有储液器的适合装置能够使用标准的硅光刻和蚀刻技术来制造。使用这样的技术也可以控制纳米通道的长度。储液器以及相关的微流体区,包括微流体界面区,能够使用标准的晶片(Si 晶片-Si 晶片)结合技术来密封,例如热结合、透明盖(例如石英、玻璃或塑料)的粘合性结合。

[0065] 缩窄适合位于纳米通道的一端。但是,在某些实施方案中,缩窄位于纳米通道内。缩窄的最终位置取决于用户的需要。纳米通道内部的缩窄能如下制造:如本文进一步所描述,使用牺牲材料作为填料(参见,例如,下面进一步讨论的实施例 7)。

[0066] 适合的纳米通道的长度在至少大约 10nm、或至少大约 15nm、或至少大约 20nm、或至少大约 30nm、至少大约 50nm、或甚至至少大约 100nm、至少大约 500nm、或至少大约 1000nm。在某些实施方案中,纳米通道所含的长度至少等于线性化大分子的大约长度。

[0067] 适合的纳米通道还具有有效内径,为大约 0.5nm 到大约 1000nm,或大约 10nm 到大约 500nm、或大约 100nm 到大约 300nm、或大约 150nm 到大约 250nm。纳米通道的有效内径也可以为至少大约 15nm、或至少大约 20nm、或至少大约 30nm、或至少大约 40nm、或至少大约 50nm、或至少大约 60nm、或至少大约 70nm、或至少大约 80nm、或至少大约 90nm、或至少大约 100nm。正如所讨论,纳米通道包含的有效内径能够将大分子维持在线性化形式。

[0068] 除非另有指示,术语“有效内径”和“内径”可以互换使用。术语“有效内径”不仅

指具有圆形横截面的纳米通道,而且指具有非圆形横截面的纳米通道。例如,“有效内径”可以通过假定纳米通道具有圆形横截面、并强制纳米通道的实际横截面根据具有有效内径的圆形的面积进行有效计算来确定:纳米通道的横截面积 = $\pi \times (\text{有效内径}/2)^2$ 。因此,纳米通道的有效内径可以确定为:

[0069] 有效内径 = $2[(\text{纳米通道的横截面积})/\pi]^{1/2}$

[0070] 缩窄适当地具有有效内径或有效维度,以允许大约 0.5nm 到大约 100nm、或大约 1 到大约 80nm、或大约 5 到大约 50nm、或大约 8nm 到大约 30nm、或大约 10nm 到大约 15nm 的分子运送。适合的缩窄具有能够维持线性化大分子以线性化形式通过缩窄的有效内径。有效内径或维度通过控制蚀刻条件、或通过控制缩窄区域内牺牲材料的尺寸来控制。

[0071] 本公开的装置还包括梯度,这样的梯度沿着纳米通道的至少一部分适当存在。适合的梯度包括电渗场、电泳场、毛细流、磁场、电场、放射场、机械力、电渗力、电泳力、电动力、温度梯度、压力梯度、表面性质梯度、毛细流或其任何组合。

[0072] 在某些实施方案中,梯度能够使位于纳米通道的至少一部分内的至少一部分大分子线性化。但是,在优选实施方案中,梯度能够将位于纳米通道内的大分子的至少一部分沿着纳米通道的至少一部分运送。

[0073] 装置相配地包括能够提供所述梯度的梯度发生器。适合的发生器包括电压源、磁铁、声源、压力源、或其任何组合。

[0074] 梯度发生器适宜能够施加恒定梯度。在某些实施方案中,梯度发生器也能够施加可变的梯度。在本文别处提出的实施例提供了其它细节。对于本技术领域的普通专业人员来说,显而易见的是梯度的强度和可变性将按照用户的需要来选择。

[0075] 在某些实施方案中,装置的两个或多个流体储液器含有同样的流体。在其它实施方案中,两个或多个流体储液器含有不同的流体。在某些实施方案中,不同的流体本身可用于提供大分子在纳米通道内运送所用的梯度——可以选择离子强度或其它性质不同的流体来提供这样的梯度。适合的流体包括缓冲液、酸、碱、电解质、细胞培养基、表面活性剂等。

[0076] 装置还包括检测器,该检测器能够检测从线性化大分子的至少一部分通过缩窄而产生的信号。适合检测器包括电荷耦合器(CCD)检测系统、互补金属氧化物半导体(CMOS)检测系统、光电二极管检测系统、光倍增管检测系统、闪烁检测系统、光子计数检测系统、电子自旋共振检测系统、荧光检测系统、光子检测系统、电检测系统、照相胶片检测系统、化学发光检测系统、酶检测系统、原子力显微镜(AFM)检测系统、扫描隧道显微镜(STM)检测系统、扫描电子显微镜(SEM)检测系统、光学检测系统、核磁共振(NMR)检测系统、近场检测系统、全内反射(TIRF)检测系统、膜片钳检测系统、电流检测系统、电放大检测系统、阻抗测量系统、电容检测系统等。

[0077] 适合检测器能够监测一个或多个流体储液器内的一个或多个位置,或者,在其它实施方案中,能够监测纳米通道内的位置,甚或靠近纳米通道末端的位置。对于用户来说,显而易见的是运用一个或多个能够在不同位置检测不同信号的检测器,能够对给定大分子的多种特征进行表征。

[0078] 在某些实施方案中,装置包括照射器。适合的照射器包括激光器、可见光源、放射性粒子源、磁铁、紫外光源、红外光源或其任何组合。在某些实施方案中,照射器用于激发纳米通道内大分子的部分。作为非限制性例子,某种波长的光源被用于激发位于大分子上某

些特定位置上的荧光标记物,以致引发这些标记物的呈现。

[0079] 装置还相配地包括数据处理器。在某些实施方案中,装置包括数据记录器。这样的处理器被用于大数据组的操作和关联。

[0080] 图 4 中显示了所公开装置的一个实施方案,其描绘了在接近储液器的一端缩窄的纳米通道,以及监测其中运送进来线性大分子的储液器中产生的信号的检测器。图 5 中显示了另一个实施方案,其中缩窄连接两个纳米通道。在图 5 中,可以看出检测器监测跨过缩窄的纳米通道组件产生的一个或多个信号。

[0081] 正如本文别处所讨论,当要分析相当长的大分子时,首先将大分子的一端运送到纳米通道的一端中。正如所讨论,这可以通过例如帮助这种投送的梯度结构来实现;适合的梯度结构描述在 Cao 等的美国专利 No. 7, 217, 562 中,其全文在此引为参考。

[0082] 还公开了运送大分子的方法。这样的方法包括提供至少两个流体储液器并提供至少部分线性化的大分子,该大分子的至少一部分位于纳米通道中。如本文别处所讨论,该大分子可以通过约束在维度适当的纳米通道中来线性化,该纳米通道的内径小于线性化大分子回转半径的大约两倍。

[0083] 适合的纳米通道使储液器彼此之间流体连通。正如本文别处所述,适合的纳米通道还包括缩窄。适合的缩窄的维度在本文别处描述。

[0084] 该方法还包括对大分子施加梯度。该梯度适宜地引起线性化大分子的至少一部分在纳米通道的至少一部分中被运送。适合的梯度包括电渗场、电泳场、毛细流、磁场、电场、放射场、机械力、电渗力、电泳力、电动力、温度梯度、压力梯度、表面性质梯度、毛细流或其任何组合。根据用户的需要,梯度可以相宜地是恒定的或变化的。

[0085] 储液器的体积一般比纳米通道段的体积大。储液器可以是几乎任何形状和大小。例如,储液器可以是圆形、球形、矩形或其任何组合。储液器的大小将根据用户的需要指定,并且可以改变。

[0086] 本公开的方法的纳米通道的长度大于大约 10nm、或大于大约 12nm、或大于大约 14nm、或大于大约 16nm、或大于大约 18nm、或大于大约 20nm、或大于大约 25nm、或大于大约 30nm、或大于大约 35nm、或大于大约 40nm、或大于大约 45nm。在某些实施方案中,纳米通道的长度大于大约 100nm 或甚至大于大约 500nm。适合的纳米通道的长度也可以大于大约 1 微米、或大于大约 10 微米、或大于大约 100 微米、或大于大约 1mm、甚或长度大于大约 10mm。在某些实施方案中,选择纳米通道的长度超过线性化大分子的大约长度。

[0087] 还公开了制造缩窄的纳米通道的方法。这些方法首先包括提供纳米通道。适合的纳米通道的有效内径为大约 0.5nm 到大约 1000nm,或大约 1nm 到大约 500nm、或大约 5nm 到大约 100nm、或大约 10nm 到大约 15nm。纳米通道的有效内径也可以为至少大约 15nm、或至少大约 20nm、或至少大约 30nm、或至少大约 40nm、或至少大约 50nm、或至少大约 60nm、或至少大约 70nm、或至少大约 80nm、或至少大约 90nm、或至少大约 100nm。

[0088] 该方法还包括在纳米通道内的位置上、邻近纳米通道末端的位置上、或这两个位置上减小纳米通道的有效内径的步骤,以致在纳米通道内或附近产生缩窄,缩窄的内径与纳米通道流体连通。缩窄范例显示在图 1b、图 4、图 5 和图 6 中。适合的纳米通道能够将线性化的大分子维持在其线性形式;正如本文别处所讨论,这适宜通过使用适合维度的纳米通道段来完成,以便对大分子进行物理制约,从而将大分子维持基本线性的形式。缩窄的纳

米通道减小的内径适宜地能够允许线性化大分子的至少一部分通过。

[0089] 在一个实施方案中,通过将一种或多种材料附加沉积在纳米通道内或外,来减小纳米通道的内径以致形成缩窄。这是通过溅涂、喷涂、物理蒸汽沉积、化学蒸汽沉积或其任何组合来适当完成。在某些实施方案中,附加沉积在纳米通道被完全堵塞前停止。这描绘在图 6a 和 6b 中,其中显示了附加性材料沉积在靠近纳米通道的一个末端,沉积在纳米通道被完全堵塞前停止。这样的纳米通道也显示在图 9 中,其中当纳米通道的末端(图 9a)通过附加材料的各种沉积(图 9b 和 9c)减小时,可以看到有效内径的减小。

[0090] 在本发明的其它实施方案中,附加沉积在纳米通道被完全堵塞后停止。在这些实施方案中,方法包括通过除去至少一部分沉积的附加材料,对密封的纳米通道重新开口的步骤。这是通过蚀刻适当完成的。蚀刻过程需要将沉积的附加性材料的一侧与能够蚀刻沉积的附加材料的第一种物类相接触,以及将沉积的附加材料的另一侧与接触第一种物类后减缓蚀刻物类的蚀刻活性的第二种物类相接触。在某些实施方案中,第二种物类在与第一种物类接触后能够终止蚀刻物类的蚀刻活性。这描绘在图 7a 中,其中密封材料施加在纳米通道的一端,然后在图 7b 中被强碱性溶液蚀刻掉,在图 7c 中,当碱性溶液蚀刻贯通密封材料并被位于密封材料的相反侧的强酸中和时,蚀刻停止。对于本技术领域的人员来说,显然的是纳米通道中的条件、第一种和第二种物类的相对量以及其它的操作参数将会调整,从而获得所需的直径。

[0091] 在另外的其它实施方案中,减小纳米通道的内径包括几个步骤:(图 8a)将牺牲材料放置在纳米通道内,(图 8b)将附加材料沉积到牺牲材料附近以致完全堵塞纳米通道,以及(图 8c)选择性除去至少一部分牺牲材料同时留下基本完整的相近的附加材料,以致产生维度为除去的牺牲性材料的减小的纳米通道内径。对于本技术领域的普通专业人员来说,显然本发明的这个方面可用于在纳米级或较大的通道内或在其它结构内制造具有各种维度的孔隙。DNA 和碳纳米管都被认为是合适的牺牲材料。其它可以被选择性溶解或蚀刻掉的材料对于本技术领域的普通专业人员来说是显而易见的。

[0092] 本发明还提供了将大分子线性化,以便将大分子的自由度从三维制约到基本上一维的方法。这些方法包括将大分子放置到纳米通道中,纳米通道的至少一部分能够对大分子的至少一部分进行物理制约,以便将大分子的该部分维持在线性形式。

[0093] 纳米通道相配地包含缩窄。缩窄的适合维度在本文别处描述。

[0094] 在某些实施方案中,方法还包括对大分子施加梯度,使得大分子的至少一部分线性通过纳米通道的缩窄。适合的梯度包括电渗场、电泳场、毛细流、磁场、电场、放射场、机械力、电渗力、电泳力、电动力、温度梯度、压力梯度、表面性质梯度、毛细流或其任何组合。

[0095] 本公开的方法的微通道适合使两个或多个流体储液器彼此之间流体连通。

[0096] 适合的纳米通道包括的内径小于大分子线性构象的回转半径的大约两倍。纳米通道相适合的长度为至少大约 10nm、至少大约 50nm、至少大约 100nm、至少大约 500nm。纳米通道的适合内径为大约 0.5nm 到大约 1000nm,或大约 5nm 到大约 200nm,或大约 50nm 到大约 100nm。

[0097] 实施例以及其它说明性实施方案

[0098] 下面是非限制性实施例和说明性实施方案,并且绝不限本发明的范围。

[0099] 一般性步骤填充材料的沉积由溅涂、CVD、使用以不同角度倾斜的样品晶片进行电

子束蒸发来提供。该步骤被用于减小纳米通道的开口以及在通道的末端产生有锥度的口。

[0100] 典型情况下,为了制造封闭的纳米通道,将 100-340nm 的 SiO_2 沉积到通道开口上。使用所测试的各种沉积条件获得有效密封。当气体压力为 30mTorr、RF 功率为 ~900W、以及 DC 偏置为 1400V 时,获得了 ~9nm/ 分钟的沉积速率。在 5mTorr 的较低压力下,沉积速度增加到估计 17nm/ 分钟。通过在 5mTorr 下进行溅涂将填充材料沉积在纳米通道开口上。关于制造纳米通道阵列和装置的进一步详细情况可以在美国专利申请公布 No. US2004-0033515A1 和 US2004-0197843A1 中找到,其全部内容在此引为参考。

[0101] 实施例 1:提供了具有多个平行的线性通道的硅基片,通道的沟槽宽度为 150nm,沟槽高度为 150nm。这些通道开口在气体压力 5mTorr 下按照上面给出的一般性步骤溅涂。溅涂沉积时间为 10-25 分钟,以提供能够被部分密封或完全密封的纳米通道阵列。

[0102] 实施例 2:本实施例提供了使用电子束沉积技术的封闭纳米通道。基片按照实施例 1提供。通过电子束(热)蒸发器(Temescal BJD-1800)将二氧化硅沉积到基片上。基片能够放置得针对来自二氧化硅源靶的沉积束入射成不同的角度;沉积速度可以设置为大约 3nm/ 分钟,在大约 50 分钟内能沉积大约 150nm 密封材料。密封物质的沉积束的入射角度能够改变,以将通道的宽度和高度分别减小到少于 150nm 和 150nm,并通过提供低(shallow)切线沉积角度将通道基本密封。

[0103] 实施例 3:在本实施例中,纳米通道阵列可以与表面修饰剂相接触。按照实施例 1 制造的纳米通道阵列能够被浸泡在溶液中,以便于润湿并减少非特异性结合。溶液可含有在甲苯中聚乙二醇硅烷,浓度为 0.1 - 100mM,并与纳米通道阵列保持接触大约 1 小时到大约 24 小时。随后在乙醇和水中清洗,用于除去未接合的物质。

[0104] 实施例 4:本实施例描述了用于纳米流体芯片的带有纳米通道阵列的样品储液器。带有 100nm 宽、100nm 深纳米通道的纳米通道阵列按照实施例 1中的一般性步骤制造。纳米通道阵列使用光致抗蚀剂例如 AZ-5214E 旋涂,并使用 Karl Suss MA6 准直仪用光掩膜通过光刻来组成图型,以在通道阵列的相反一端提供制备储液器的区域。暴露的区域使用反应性离子蚀刻法在 Plasma-Therm720SLR 中进行蚀刻,采用 5mTorr 压力和 100W 的 RF 功率下 CF_4 和 O_2 的组合,蚀刻速率为 20nm/ 分钟,以暴露纳米通道的末端并在基片边缘处通道的相反末端上提供大约毫米宽、微米深的储液器。

[0105] 实施例 5:本实施例描述了用含有 DNA 大分子的流体填充纳米流体芯片以分析 DNA。将直径 2mm 的圆柱形塑料样品投送管放置成与实施例 3的纳米通道的储液器之一流体连通。投送管能够与外部样品投送/ 收集装置连接,该装置又能与压力/ 真空产生设备连接。用毛细作用将纳米通道用缓冲溶液润湿。含有染色的例如 λ 噬菌体大分子(λ DNA)的缓冲溶液通过电场(1-50V/cm)引入到纳米通道阵列中;溶液浓度为 0.05-5 微克/mL, λ DNA 以 10:1 碱基对/ 染料的比率用 TOTO-1 染料(Molecular Probes, Eugene, Oregon)染色。将该染色的 DNA 溶液在含有 0.1M 抗氧化剂和 0.1% 线性聚丙烯酰胺作为抗粘着剂的 0.5xTBE (Tris- 溴乙酸酯缓冲液, pH7.0) 中稀释到 0.01-0.05 微克/mL。

[0106] 实施例 6:本实施例描述了使用酸蚀刻在纳米通道末端制造纳米口。纳米口装置的制造始于实施例 1中提供的具有封闭纳米通道的完成的硅纳米通道。通过在通道的暴露末端溅涂薄层的铬来继续产生纳米孔。使用 Temescal 系统的溅涂能够以亚纳米的精确度来控制,0.01 - 1nm/ 秒的速度下沉积量为 5-200nm,或直到纳米通道的末端完全被铬覆盖。

然后运用湿法蚀刻工艺在铬上开小于 10nm 的孔。稀释的铬蚀刻剂例如 Cr^{-7} 能够用毛细管力或其它形式的抽吸流进通道中。稀释可以在 1X 到 10,000X 的范围内。因为 Cr^{-7} 是高度选择性的酸蚀刻剂,它优先与通道末端的铬反应而不是与硅通道本身反应。为了终止蚀刻,一旦孔打开后,通道的外部区域将充有高浓度的碱溶液(例如氢氧化钠),一旦打通后将快速中和弱酸。在随后清洗装置后,将在纳米通道的末端产生纳米级口。

[0107] **实施例 7:** 本实施例描述了如何使用牺牲大分子制造纳米口芯片。具有纳米通道连接的输入/输出流体储液器的纳米流体芯片被用于使双链 DNA 线性化(图 8a)。在本实施例中,优选长度为大约 1-10Mbp、用 YOYO-1 均匀染色的 DNA 长片段。DNA 的浓度应该在 0.5 微克/mL 左右,染料的染色比例为 10:1 碱基对/染料。缓冲溶液由含有 0.1M 抗氧化剂和 0.1% 线性聚丙烯酰胺用作抗粘着剂的 0.5xTBE (Tris- 溴乙酸酯缓冲液, pH7.0) 构成。使用纳米流体芯片和以前描述的步骤(Cao2002),将牺牲 DNA 分子的溶液流入到芯片的纳米通道中,在此它们在出口储液器处离开纳米通道。使用荧光成像显微镜,实时地观察 DNA 分子的出来,它们的移动通过在储液器上施加电场(1-50V/cm)来控制。对于这样的流程来说,所需的 DNA 片段的位置可以是悬挂的,使得只有一部分从纳米通道出来。然后将纳米通道芯片在真空环境下在 50° C 干燥,除去残留的缓冲溶液,以便目标 DNA 片段保持部分在纳米通道内部。纳米通道表面与 DNA 片段之间的相互作用、例如通过范德瓦耳斯键合,在干燥过程中将片段的位置维持在通道中。

[0108] 在纳米通道芯片干燥后,将材料例如二氧化硅沉积在芯片表面上(图 8b),使得进入纳米通道的入口成为被阻断,并封闭 DNA 片段。必须仔细选择材料的沉积速率和沉积温度,使得 DNA 片段在该过程中不受损。在使用冷却台保持在 -160° C 的样品上以 0.2A/s 以下蒸发材料,显示出保护小的有机分子免于受损(Austin2003)。为了在纳米通道周围获得均匀的覆盖以适合地形成纳米口,在蒸发过程中将台旋转并倾斜。为了完全封闭直径为 80nm 的纳米通道,将要蒸发大约 200nm 的二氧化硅材料。

[0109] **实施例 8.** 装置的操作 - 用于单链核酸测序的电测量:在纳米通道装置上施加偏压,该纳米通道具有置于在纳米通道一端的内径大约 1.5nm 的缩窄(纳米门或纳米口),纳米通道长度大约 200 微米,对于使用与纳米通道每一端的储液器接触的电极(可以是铜、银、钛、铂、金或铝)进行测序的单链核酸来说,储液器的维度为直径大约 5-100 微米和深度 1-2 微米。电极放置在储液器中,有导线引向流体区域外部,用于连接电流监测器。可以使用 100mV - 100V 的电压范围。在每个储液器中放置生物缓冲液(TE、TBE、TAE),使用适合的流体投送泵或注射器,毛细管作用和压差协助润湿纳米流体装置。将在缓冲液(1 纳升直至大约 100 微升)中的核酸样品(例如 100 个碱基的 ssDNA 以上,至少 1000 个碱基、或 10000 个碱基、或 100000 个碱基、或 1 百万、甚或 1 千万、甚或 1 亿,直到染色体长度)投送到一个或全部两个储液器中。施加梯度以帮助一个或多个多聚核酸分子运送到纳米通道中的缩窄之中。施加场,具体到本实施例,是受控的电压梯度,施加电流,从一个储液器、通过纳米通道、通过缩窄内带有多聚核酸的缩窄、并进入到第二个储液器中。检测流过该系统的电流并使用 Axopatch200B (Molecular Devices) 膜片钳放大器放大。测量到的典型电流为大约 100fA 到大约 1uA,当 DNA 通过缩窄移动时,波动大约为几百皮安培。与单链 DNA 结合的标记物能够产生附加的电流波动,其量级小于 DNA 自身产生的波动。对于以单碱基的空间分辨率进行测量的情况来说,典型的移位速度使得测量系统能够登记每个碱基一次测量的最小

值。在使用 100kHz 带宽的 Axopatch200B 的情况下,假定 DNA 分子在纳米通道中伸展 50%,则最大移位速度是 100kB/ 秒。这给出了 DNA 通过缩窄(constriction)的移位速度是大约 0.015nm/ 微秒。测量度量电流差,并与一组(set)校正标准值相关联,以产生 DNA 样品的序列。

[0110] 将分析各种不同靶分子的适合的横截面维度制表的样表显示如下:

[0111] 表

[0112]

分析的靶分子	缩窄的最小横截面维度 (nm)
ss-DNA	1.5
ss-DNA + 互补链	2
带有缺口、间隙或损伤的 ds-DNA	2
ds-DNA	2
ds-DNA + 部分 (例如甲基基团、标记基团)	2.1
ds-DNA + 小化合物	2.5
ds-DNA + 第三链探针	3.5
ds-DNA + 生物素	5
ds-DNA + 蛋白结合因子 (例如转录因子)	4-15
ds-DNA + 珠子 (例如量子点、磁珠)	10-50

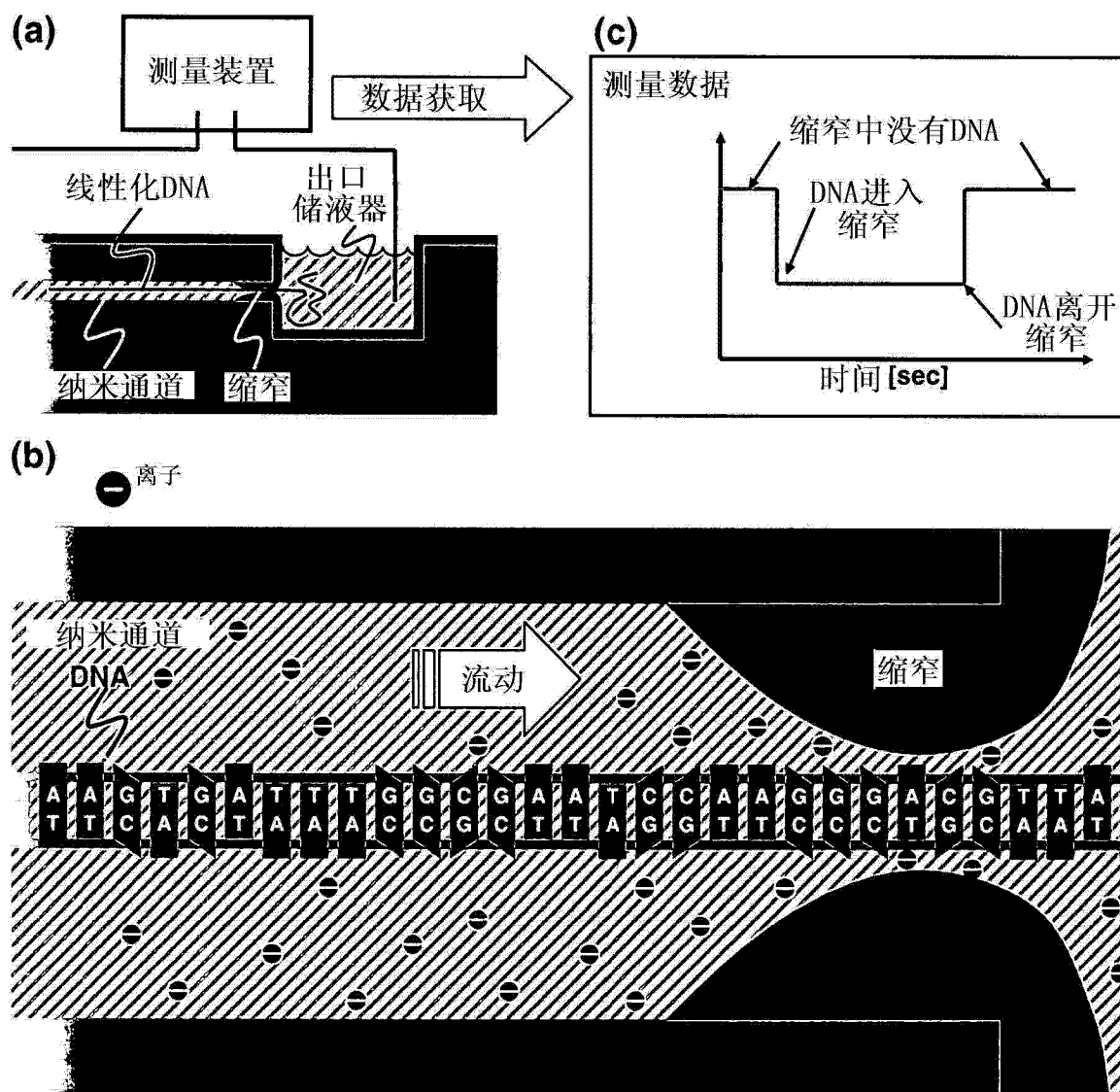


图 1

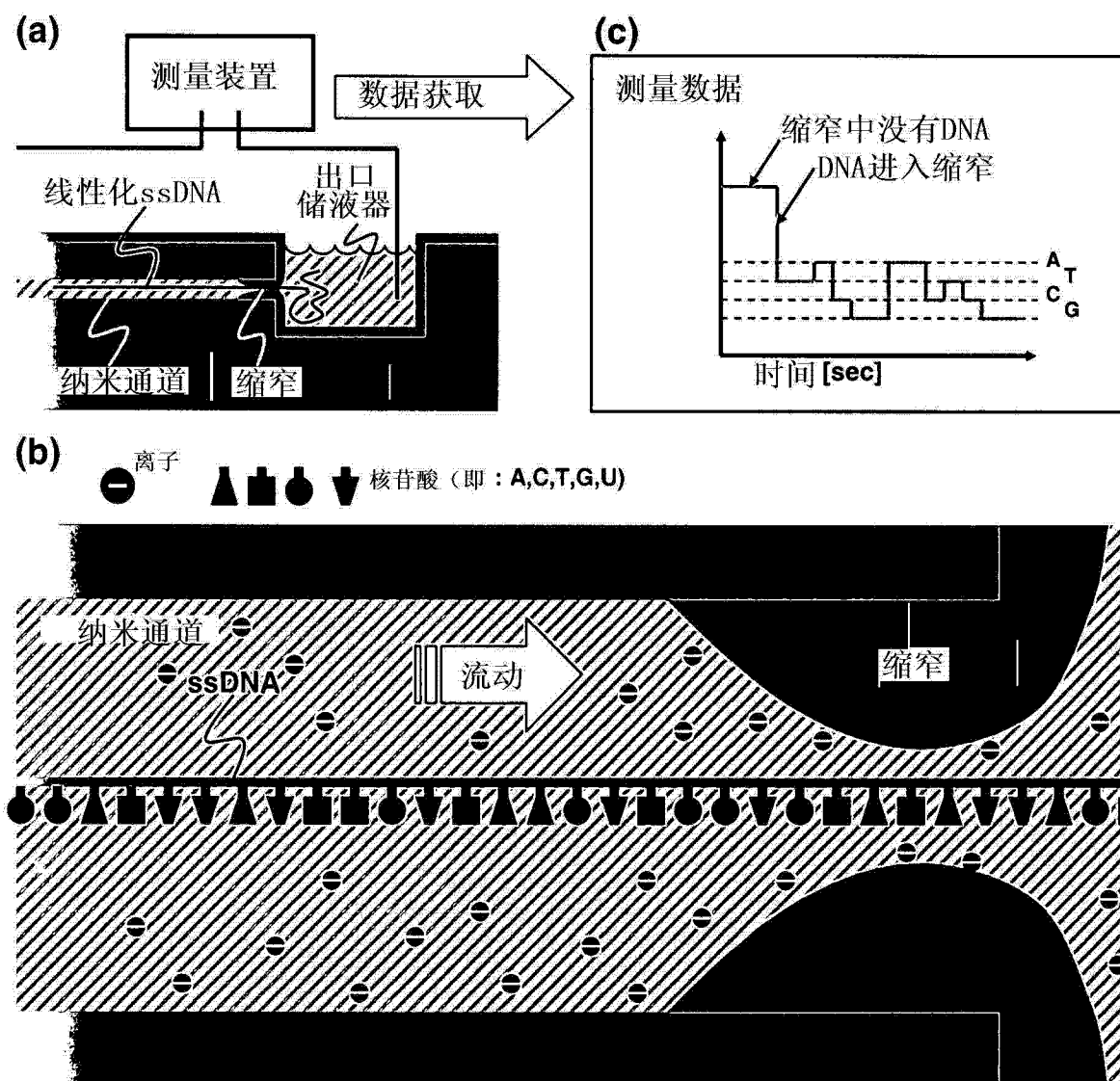


图 2

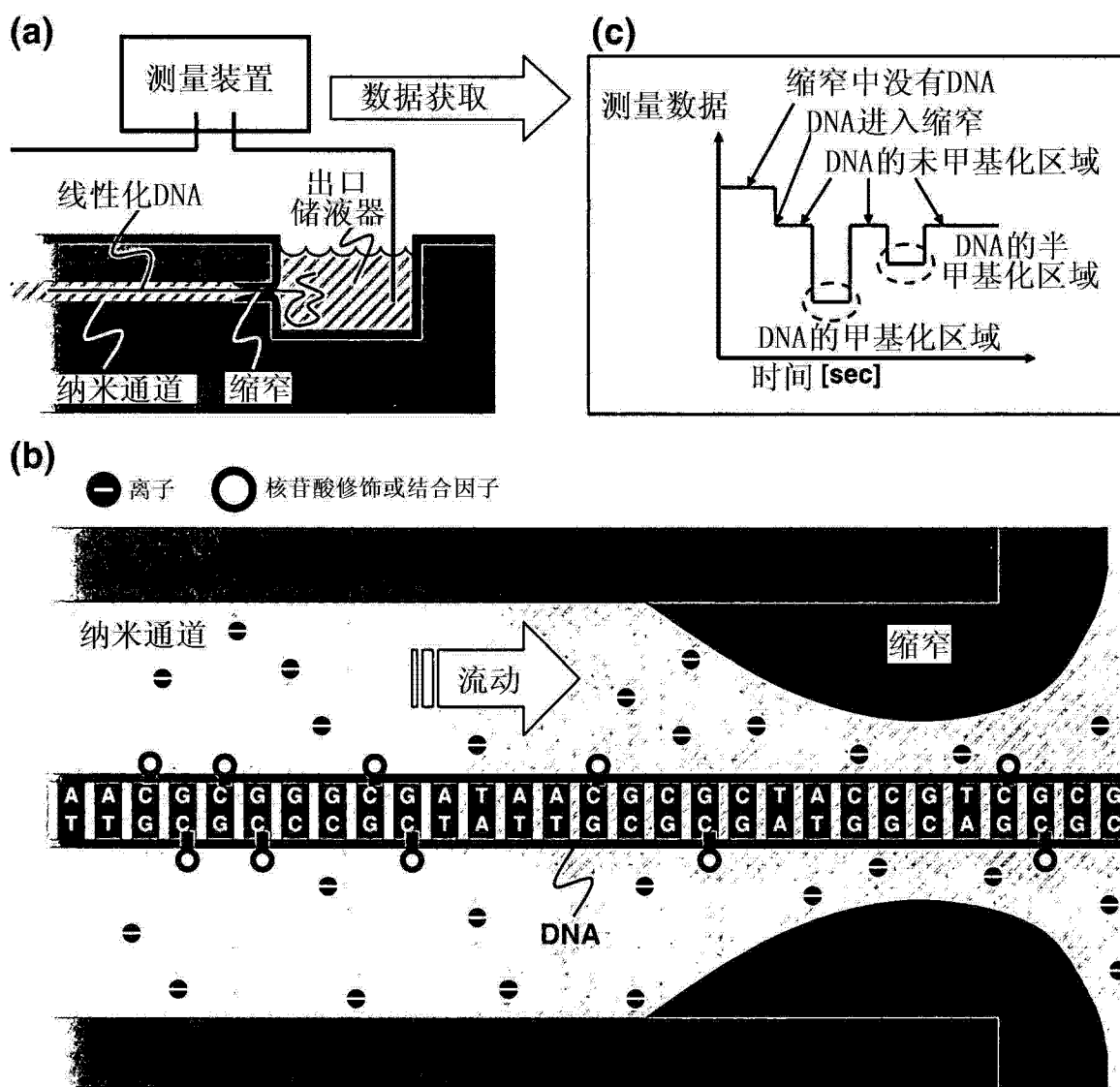


图 3

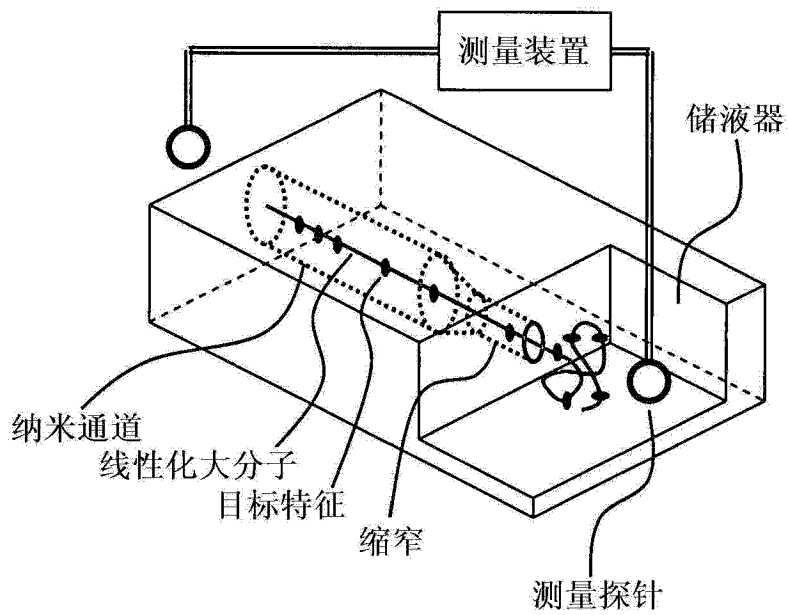


图 4

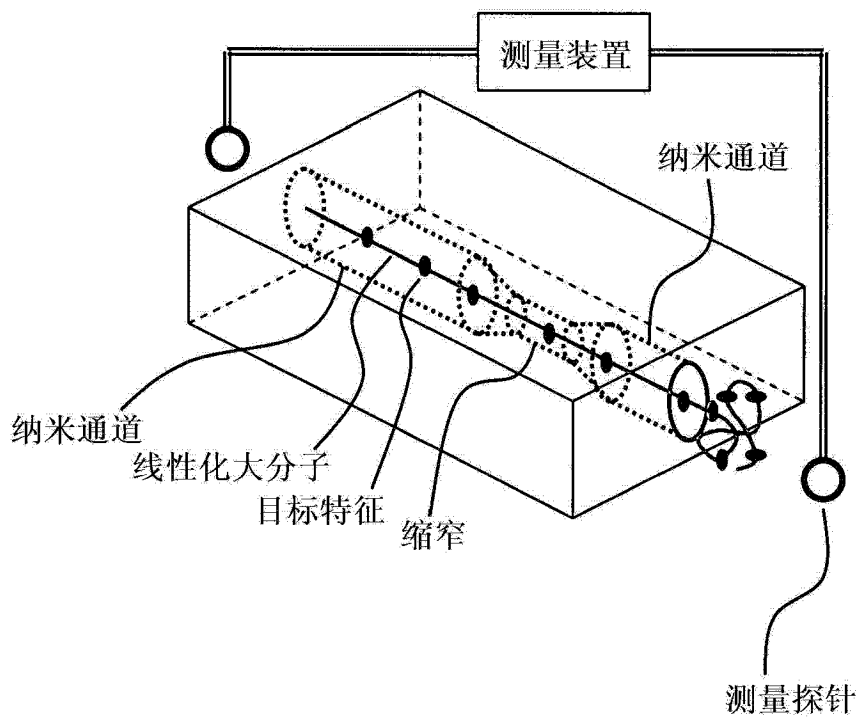


图 5

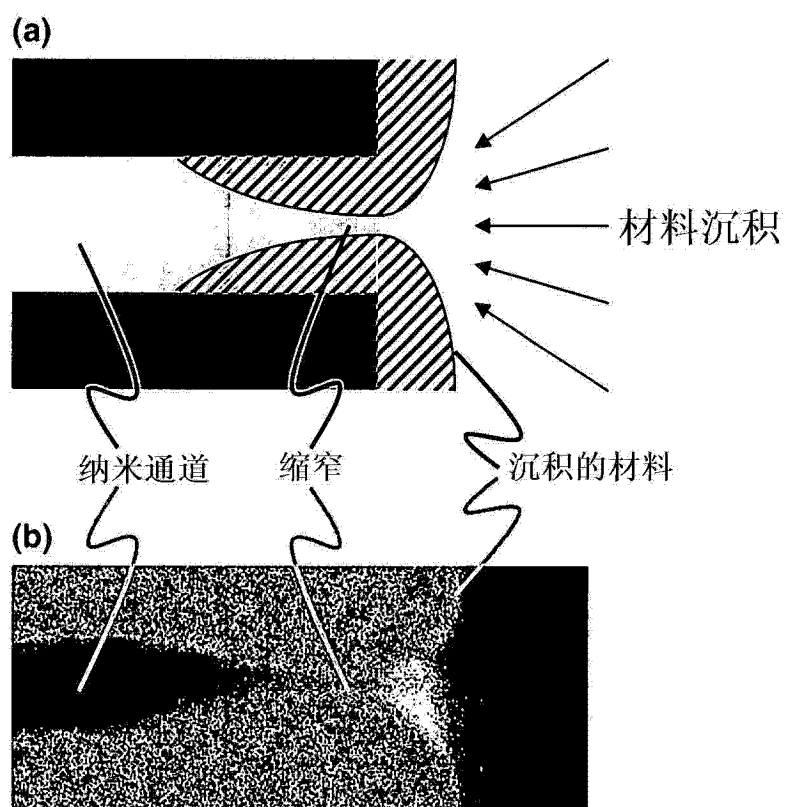


图 6

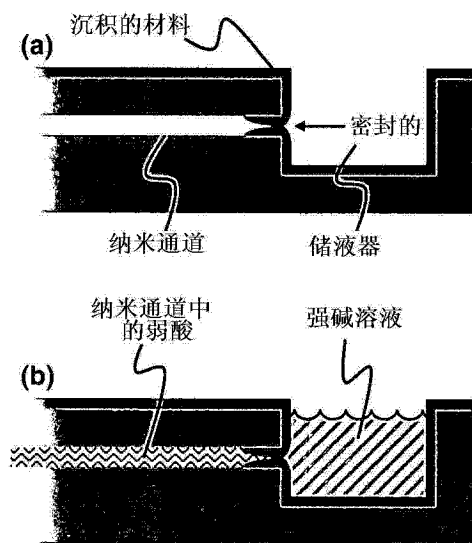


图 7

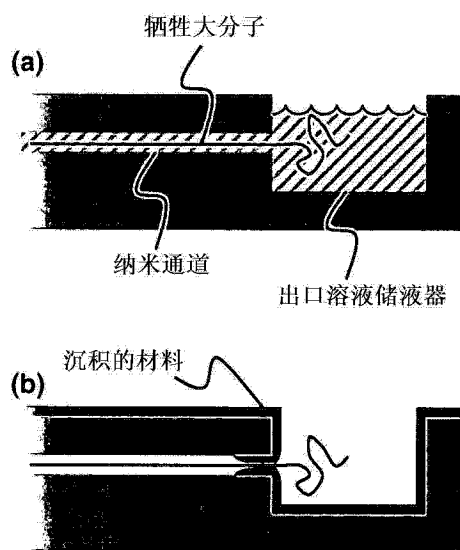


图 8

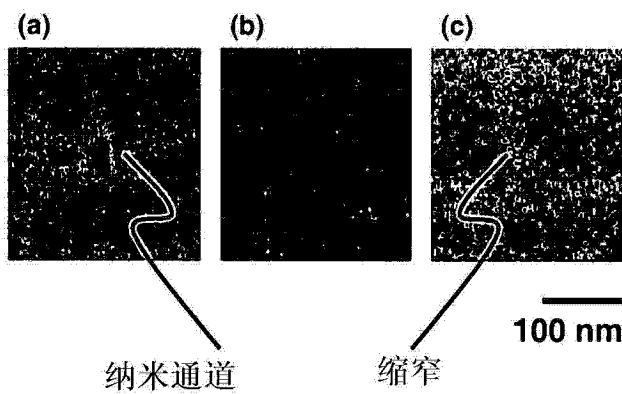
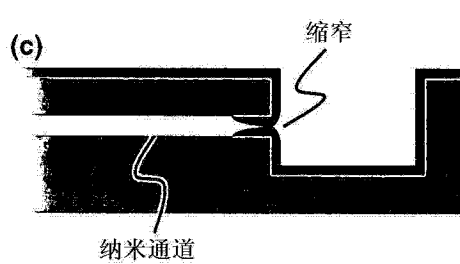
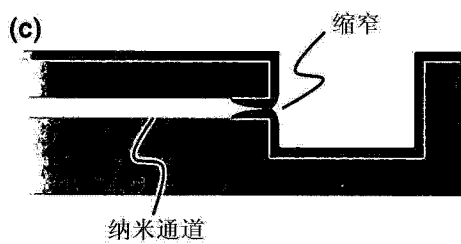


图 9