



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105637082 B

(45)授权公告日 2019.02.15

(21)申请号 201480056839.5

A.阿圭尔 A.特兰斯 J.波拉

(22)申请日 2014.10.23

C.切奇

(65)同一申请的已公布的文献号

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

申请公布号 CN 105637082 A

代理人 李唐 彭昶

(43)申请公布日 2016.06.01

(51)Int.Cl.

C12M 1/34(2006.01)

(30)优先权数据

61/894,661 2013.10.23 US

(56)对比文件

US 2007105089 A1,2007.05.10,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2007127327 A2,2007.11.08,

2016.04.15

US 2010331194 A1,2010.12.30,

(86)PCT国际申请的申请数据

WO 2013123450 A1,2013.08.22,

PCT/US2014/061854 2014.10.23

US 7899996 B2,2011.03.01,

(87)PCT国际申请的公布数据

WO 2013063126 A2,2013.03.02,

W02015/061511 EN 2015.04.30

US 2013087467 A1,2013.04.11,

(73)专利权人 吉尼亚科技公司

审查员 刘宝

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 R.W.戴维斯 E.S.刘 E.T.哈拉达

权利要求书1页 说明书32页 附图21页

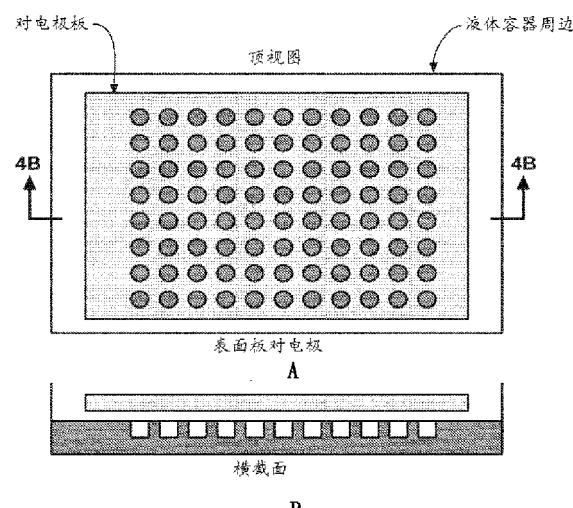
(54)发明名称

用于生物传感器小孔形成的方法

(57)摘要

公开了用于分子检测和感测的生物芯片。所述生物芯片包括衬底。所述生物芯片包括多个在所述衬底上形成的具有大于每平方毫米500个小孔的密度的离散位点。每一个离散位点包括配置在所述衬底上以形成小孔的侧壁。每一个离散位点包括配置在所述小孔底部的电极。在一些实施方案中，形成所述小孔，以使得所述小孔之间的串扰减小。在一些实施方案中，将配置在所述小孔底部的电极组织成组的电极，其中每一组电极共享共同的对电极。在一些实施方案中，配置在所述小孔底部的电极具有专用对电极。在一些实施方案中，使所述侧壁的表面硅烷化，以使得所述表面促进膜在所述小孔中或所述小孔附近的形式。

CN 105637082 B



1. 一种生物芯片，所述生物芯片包含：
半导体衬底；和
多个在所述衬底上形成的具有大于每平方毫米500个小孔的密度的离散位点，其中每一个离散位点包括：
配置在所述衬底上以形成小孔的侧壁，其中通过在所述衬底上沉积具有活性氧化物基团的二氧化硅材料和将所述小孔蚀刻至所述二氧化硅材料中来形成所述小孔，并且其中所述侧壁具有疏水性的硬的平面顶部表面以便在顶部形成膜，其中所述膜横跨所述小孔并将小孔中的第一流体与小孔外部的第二流体隔绝；和
配置在所述小孔底部的电极。
2. 根据权利要求1所述的生物芯片，其中形成所述小孔以使得所述小孔之间的串扰减小，包括将所述电极彼此电分离以减小来自通过相邻小孔中的纳米孔的离子流动的信号与配置在不同小孔底部的电极串扰。
3. 根据权利要求1所述的生物芯片，其中配置在所述小孔底部的电极从最接近所述电极的插入膜中的纳米孔或膜产生大部分的其信号。
4. 根据权利要求1所述的生物芯片，其中将配置在所述小孔底部的电极组织成多组电极。
5. 根据权利要求4所述的生物芯片，其中每一组电极共享共同的对电极。
6. 根据权利要求1所述的生物芯片，其中配置在所述小孔底部的电极具有专用对电极。
7. 根据权利要求1所述的生物芯片，其中所述侧壁的表面是疏水性的，以使得所述表面促进疏水性膜在所述小孔中或所述小孔附近的形成。
8. 根据权利要求7所述的生物芯片，其中使所述侧壁的表面硅烷化，以使得所述表面促进膜在所述小孔中或所述小孔附近的形成。
9. 根据权利要求8所述的生物芯片，其中促进膜在所述小孔中或所述小孔附近的形成包括：
促进所述膜至所述硅烷化表面的附着。
10. 根据权利要求8所述的生物芯片，其中通过用一层有机官能烷氧基硅烷分子覆盖所述侧壁来使所述侧壁的表面硅烷化。
11. 根据权利要求10所述的生物芯片，其中所述分子的层的厚度为一个分子。

用于生物传感器小孔形成的方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月23日提交的标题为“Methods for Forming Lipid Bilayers on Biochips”的美国临时申请第61/894,661号的权益，所述临时申请通过引用整体并入本文。

[0003] 背景

[0004] 生物芯片可用于各种类型的分子检测和感测，包括核酸分子的测序。核酸测序是一个可用于提供核酸样品的序列信息的过程。此类序列信息在对受试者进行诊断和/或治疗中可能是有帮助的。例如，受试者的核酸序列可用于鉴别、诊断遗传疾病，并且可能开发针对该遗传疾病的治疗。作为另一个实例，对病原体的研究可导致针对接触性传染病的治疗。

[0005] 有可获得的方法可用于对核酸进行测序。然而，此类方法是昂贵的，而且可能无法在一个时间段内精确地提供对诊断和/或治疗受试者而言可能是必要的序列信息。

[0006] 概述

[0007] 纳米孔可用于检测各种分子，包括但不限于对聚合物诸如核酸分子进行测序。本文中认识到需要改进的生物芯片和制造生物芯片（例如，包含纳米孔）的方法。在一些情况下，常规半导体加工技术在生产用作生物芯片的硅装置中是有缺陷的。例如，提供了可生产经受住（例如，在接触过程中或之后可运行的）高腐蚀环境诸如水溶液（例如，包含离子）的生物芯片的方法。在另一个方面，本文所述的方法产生有助于有机膜（例如，脂质双层）形成的生物芯片表面。在另一个方面，所述方法提供了进行生物芯片中的离子电流流的电测量所需的电化学电极。

[0008] 除其它以外，根据本文所述的方法产生的生物芯片可用于核酸分子鉴定和聚合物（例如，核酸）测序。在一些情况下，聚合物穿过纳米孔，而该聚合物的各种亚单位（例如，核酸的腺嘌呤（A）、胞嘧啶（C）、鸟嘌呤（G）、胸腺嘧啶（T）和/或尿嘧啶（U）碱基）影响流过纳米孔的电流。如本文所述，可通过在跨纳米孔和/或跨膜施加的多个电压下测量电流来鉴定各种亚单位。在一些情况下，标记的核苷酸的聚合将标签分子释放和/或呈递至纳米孔，所述标签分子可通过在多个跨纳米孔和/或膜施加的电压下测量电流来鉴定。

[0009] 在一个方面，本公开提供了用于形成用于纳米孔感测装置的脂质双层的方法，所述方法包括：(a) 提供包含与多个感测电极连通的流体流路的芯片；(b) 使脂质溶液流入流体流路；和(c) 使至少一个气泡流至流体流路上，从而形成与感测电极相邻的脂质双层，其中所述气泡横跨多个感测电极，并且其中所述气泡与感测电极相邻，持续至少约1秒。在一些实施方案中，所述气泡与感测电极相邻，持续约1ms至约5分钟之间。

[0010] 在一些实施方案中，所述气泡与感测电极相邻，持续至少约30秒。在一些实施方案中，所述气泡与感测电极相邻，持续至多约5分钟。在一些实施方案中，在至少50%的感测电极上方形成脂质双层。在一些实施方案中，在至少70%的感测电极的上方形成脂质双层。

[0011] 在一些实施方案中，所述方法还包括将纳米孔插入与每一个感测电极相邻的脂质双层。在一些实施方案中，所述芯片包含小孔，并且其中所述感测电极存在于小孔中。

[0012] 在另一个方面,本公开提供了用于形成用于纳米孔感测装置的脂质双层的方法,所述方法包括:(a)提供包含与多个感测电极流体连通的流体流路的芯片;(b)使至少一个气泡流入流体流路并与所述多个感测电极相邻,以使得所述气泡横跨多个感测电极;和(c)将气泡的周边与脂质接触,其中所述脂质在气泡下方扩散并扩散至流体流路上,从而形成与感测电极相邻的脂质双层。

[0013] 在一些实施方案中,使所述气泡与脂质接触至少约30秒。在一些实施方案中,使所述气泡与脂质接触约5ms至约5分钟。在一些实施方案中,在至少70%的感测电极上方形成脂质双层。在一些实施方案中,所述方法还包括将纳米孔插入与每一个感测电极相邻的脂质双层。在一些实施方案中,所述纳米孔为耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)孔蛋白A(MspA)、 α -溶血素、与耻垢分枝杆菌孔蛋白A(MspA)或 α -溶血素中的至少一个具有至少70%同源性的任何蛋白质,或其任意组合。

[0014] 在一些实施方案中,插入纳米孔包括通过所述电极施加电刺激,以促进所述纳米孔在所述脂质双层中的插入。在一些实施方案中,所述脂质双层表现出大于约 $1\text{G}\Omega$ 的电阻。

[0015] 在一些实施方案中,所述脂质双层和所述纳米孔蛋白一起表现出约 $1\text{G}\Omega$ 或更小的电阻。在一些实施方案中,所述脂质包含有机溶剂。在一些实施方案中,所述气泡为蒸汽气泡。在一些实施方案中,所述芯片包含小孔,并且所述感测电极存在于小孔中。

[0016] 在一些实施方案中,所述脂质选自由以下组成的组:二植烷酰基-磷脂酰胆碱(DPhPC)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3磷酸胆碱、1,2-二-0-植烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DoPhPC)、棕榈酰基-油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、二油酰基-磷脂酰甲酯(DOPME)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、鞘磷脂、1,2-二-0-植烷基-sn-甘油;1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-350];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-550];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-750];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-1000];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000];1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-乳糖基;GM1神经节苷脂、溶血磷脂酰胆碱(LPC)或其任意组合。

[0017] 在另一个方面,本公开提供了纳米孔传感系统,其包括:(a)包含与多个感测电极流体连通的流体流路的芯片,其中每一个所述感测电极被配置来检测核酸掺入事件后的离子电流;和(b)耦接于所述芯片的控制系统,所述控制系统被编程来:(i)将脂质溶液流入流体流路;(ii)将至少一个气泡流入流体流路并与感测电极相邻,持续至少约1秒的时间段,其中所述气泡横跨多个感测电极,并且其中所述气泡至流体流路的流动形成与感测电极相邻的脂质双层。在一些实施方案中,所述气泡与感测电极相邻,持续约5ms至约5分钟之间的时间段。

[0018] 在一些实施方案中,所述芯片包含小孔,并且其中所述感测电极存在于小孔中。在一些实施方案中,控制系统在所述芯片外部。在一些实施方案中,控制系统包含计算机处理器。在一些实施方案中,所述方法还包括可操作地耦接于所述控制系统和所述芯片的流体流动系统,其中所述流体流动系统被配置来引导所述脂质溶液和所述气泡的流动。

[0019] 本文中公开了包含衬底和多个在所述衬底上形成的具有大于每平方毫米500个小孔的密度的离散位点的生物芯片,其中每一个离散位点包括配置在衬底上以形成小孔的侧

壁和配置在小孔底部的电极。在一个实施方案中,形成所述小孔以使得小孔之间的串扰减小。在一些实施方案中,配置在小孔底部的电极从最接近电极的纳米孔或膜产生大部分的其信号。在一些实施方案中,将配置在小孔底部的电极组织成多组电极。在一些实施方案中,每一组电极共享共同的对电极。在一些实施方案中,配置在小孔底部的电极具有专用对电极。在一些实施方案中,使侧壁表面硅烷化以使得所述表面促进膜在小孔中或小孔附近的形成。在其它实施方案中,侧壁表面是疏水性的,以使得所述表面促进疏水膜在小孔中或小孔附近的形成。在另外的实施方案中,促进膜在小孔中或小孔附近的形成包括促进所述膜至硅烷化表面的附着。在一些实施方案中,通过用一层有机官能烷氧基硅烷分子覆盖侧壁来使侧壁表面硅烷化。在其它实施方案中,所述分子层的厚度为一个分子。

[0020] 通过以下的详细描述(其中仅显示并描述了本公开的说明性的实施方案),本公开的其它方面和优点对本领域技术人员而言将变得显而易见。正如将会认识到的,本公开能够有其它不同的实施方案,并且其若干细节能够在各个明显的方面进行修改,所有这些都不脱离本公开内容。因此,实际上附图和说明将被视为说明性的,而非限制性的。

[0021] 通过引用并入

[0022] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利和专利申请通过引用而并入。

[0023] 附图简述

[0024] 本发明的新颖特征在随附的权利要求中具体阐述。通过参考以下对在其中利用到本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述,将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解,并且在所述附图中:

- [0025] 图1显示基于小孔的电传感器;
- [0026] 图2显示纳米孔生物芯片;
- [0027] 图3显示其中容器兼作对电极的电极阵列;
- [0028] 图4显示具有普通对电极的电极阵列;
- [0029] 图5显示其中传感器条共有共同对电极的电极阵列;
- [0030] 图6显示其中每一个电极具有独立的对电极的电极阵列;
- [0031] 图7显示成行的共有共同电解质池的传感器小孔的实例;
- [0032] 图8显示半导体衬底的实例;
- [0033] 图9显示一层沉积在半导体衬底上的二氧化硅;
- [0034] 图10显示沉积在二氧化硅层上的光致抗蚀剂;
- [0035] 图11显示暴露于辐照以界定小孔的区域的光致抗蚀剂的区域;
- [0036] 图12显示通过干法蚀刻程序除去的二氧化硅的一部分;
- [0037] 图13显示通过湿法蚀刻程序除去另外的二氧化硅以产生小孔;
- [0038] 图14显示钛粘附层的沉积;
- [0039] 图15显示氮化钛保护层的沉积,以铂保护层或可选择地铂作为电极;
- [0040] 图16显示银电极材料的沉积;
- [0041] 图17显示光致抗蚀剂和配置于其上的材料的剥离;
- [0042] 图18显示二氧化硅的硅烷化;
- [0043] 图19显示利用凝胶填充小孔;

- [0044] 图20显示在小孔上方产生具有纳米孔的膜；
[0045] 图21显示其中银电极发生在小孔的侧壁上的生物芯片；
[0046] 图22显示保持与多个电极相邻的大的气泡；
[0047] 图23显示用于在预处理的传感器芯片的一个或多个流动通道上的电极上方形成脂质层的方法的实例；
[0048] 图24显示半导体传感器芯片的实例；
[0049] 图25显示示例性流动池的构型；
[0050] 图26显示封装芯片的实例；和
[0051] 图27显示用泵自动化的双层形成及弹出的实例。
[0052] 图28为自动芯片设置的流程图。该测试将确认芯片上的大部分池是可接受的。如果不足量的池(如由操作者决定的)通过测试，则整个芯片失败。
[0053] 图29为用于双层形成的自动泵的流程图。
[0054] 图30为在传感器芯片的小孔上方各种溶液和/或气泡的流动的举例说明。流动方向通过简图的右下角中的方框箭头指示。在该图中，第一个矩形表示离子溶液(3001；草皮图案的矩形)已流过小孔(3010)上方，脂质溶液(3015；带交叉线的矩形)在芯片上(以及在本描述中覆盖所有小孔)，并且第二个和第三个矩形表示离子溶液，以及气泡(3005；空白矩形)仍然未流至芯片上方。矩形的尺寸不代表流体的量或气泡的尺寸。可重复离子溶液-气泡-离子溶液顺序数次，以增加双层覆盖，减小非双层覆盖，例如脂质在小孔上的多层堆积，和/或在弹出测试后重建双层。一旦进行本文所述的方法，则脂双层脂质双层将在小孔(显示的)的界面(3020)或大体上平面的电极(未显示的)上形成。

[0055] 详述

[0056] 虽然本文已经显示并描述了本发明的各种实施方案，但是对本领域技术人员显而易见的是，此类实施方案仅以实例的方式提供。在不脱离本发明的情况下，本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替代。应当理解，可以使用本文所述本发明的实施方案的各种替代方案。

[0057] 本文中所用，术语“纳米孔”一般是指在膜中形成的或以其它方式提供的小孔、通道或通路。膜可以是有机膜，如脂质双层，或合成膜，如由聚合材料形成的膜。膜可以是聚合材料。纳米孔可被配置成邻近或接近感测电路或与感测电路耦接的电极，所述感测电路诸如例如互补金属氧化物半导体(CMOS)或场效应晶体管(FET)电路。在一些实例中，纳米孔具有0.1纳米(nm)至约1000nm级别的特征性宽度或直径。一些纳米孔是蛋白质。 α -溶血素是蛋白质纳米孔的一个实例。

[0058] 如本文中所用，术语“聚合酶”一般是指能够催化聚合反应的任何酶。聚合酶的实例包括但不限于核酸聚合酶或连接酶。聚合酶可以是聚合作用的酶。

[0059] 如本文中所用，术语“核酸”一般是指包含一个或多个核酸亚单位的分子。核酸可包括选自腺苷(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)或其变体的一个或多个亚单位。核苷酸可包括A、C、G、T或U，或其变体。核苷酸可包括任何可被掺入生长中的核酸链的亚单位。此类亚单位可以是A、C、G、T或U，或者是对一个或多个互补A、C、G、T或U具有特异性的，或与嘌呤(即A或G，或其变体)或嘧啶(即C、T或U，或其变体)互补的任何其它亚单位。亚单位可使得单个核酸碱基或成组的碱基(例如，AA、TA、AT、GC、CG、CT、TC、GT、TG、AC、CA

或其尿嘧啶对应物)能够被分辨。在一些实例中,核酸是脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA),或其衍生物。核酸可以是单链的或双链的。

[0060] “多核苷酸”或“寡核苷酸”为包含一个或多个如本文中定义的核苷酸的聚合物或寡聚物。多核苷酸或寡核苷酸可包含DNA多核苷酸或寡核苷酸、RNA多核苷酸或寡核苷酸,或DNA多核苷酸或寡核苷酸和/或RNA多核苷酸或寡核苷酸的一个或多个部分。

[0061] 如本文中所用,“核苷酸”或“碱基”可以是基本核苷酸或核苷酸类似物。基本核苷酸是脱氧腺苷单磷酸(dAMP)、脱氧胞苷单磷酸(dCMP)、脱氧鸟苷单磷酸(dGMP)、脱氧胸苷单磷酸(dTMP)、腺苷单磷酸(AMP)、胞苷单磷酸(CMP)、鸟苷单磷酸(GMP)或尿苷单磷酸(UMP)。核苷酸类似物是在基本核碱基(A、C、G、T和U)、脱氧核糖/核糖结构、基本核苷酸的磷酸基团或其任意组合上具有修饰的基本核苷酸的类似物或模拟物。例如,核苷酸类似物可具有经修饰的碱基,无论是天然存在的还是人造的。经修饰的碱基的实例包括但不限于甲基化的核碱基、经修饰的嘌呤碱基(例如,次黄嘌呤、黄嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、isodG)、经修饰的嘧啶碱基(例如,5,6-二氢尿嘧啶和5-甲基胞嘧啶、isodC)、通用碱基(例如,3-硝基吡咯和5-硝基吲哚)、非结合性碱基模拟物(例如,4-甲基苯并咪唑和2,4-二氟甲苯或苯)以及无碱基(无碱基核苷酸,其中核苷酸类似物不含碱基)。具有经修饰的脱氧核糖(例如,双脱氧核苷,如双脱氧鸟苷、双脱氧腺苷、双脱氧胸苷和双脱氧胞苷)和/或磷酸结构(统称为骨架结构)的核苷酸类似物的实例包括但不限于二醇核苷酸、吗啉代核苷酸和锁定核苷酸。

[0062] 术语“百分比同源性”在本文中可与本文中的术语“百分比同一性”互换使用,并且是指当使用序列比对程序进行比对时,编码本发明的多肽中任何一个的核酸序列或本发明的多肽的氨基酸序列之间的核酸或氨基酸序列同一性的水平。

[0063] 例如,如本文中所用,80%同源性与通过确定的算法测定的80%序列同一性指同一件事,并且相应地给定的序列的同源物在给定的序列的长度上具有大于80%的序列同一性。序列同一性的示例性水平包括,但不限于80、85、90、95、98%或更大的与给定的序列例如本发明的多肽的任一个的编码序列的同一性,如本文中描述的。

[0064] 可用于测定两个序列之间的同一性的示例性计算机程序包括,但不限于,可在因特网上公开获得的BLAST程序的套件,例如,BLASTN、BLASTX以及TBLASTX、BLASTP和TBLASTN。也参见,Altschul等,1990和Altschul等,1997。

[0065] 当相对于GenBank DNA序列和其它公共数据库中的核酸序列评价给定的核酸序列时,通常使用BLASTN程序进行序列搜索。BLASTX程序对于针对GenBank蛋白质序列和其它公共数据库中的氨基酸序列搜索在所有阅读框架中已被翻译的核酸序列是优选的。使用为11.0的开放缺口罚分和1.0的延伸缺口罚分的默认参数以及利用BLOSUM-62矩阵进行BLASTN和BLASTX。(参见,例如,Altschul,S.F.等,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997.)

[0066] 使用例如MacVector 13.0.7版中的CLUSTAL-W程序(利用默认参数(包括10.0的开放缺口罚分、0.1的延伸缺口罚分和BLOSUM 30相似性矩阵)运行的)进行所选定的序列的优选比对(以测定两个或更多个序列之间的“百分比同一性”)。

[0067] 生物芯片和核酸测序

[0068] 基于小孔的传感器(例如,生物芯片)可用于单分子的电询问(electro-interrogation)。本公开的基于小孔的传感器可包括在邻近或靠近感测电极配置的膜中形

成的纳米孔。所述传感器可包括对电极。所述膜包括反侧(即,面对感测电极的面)和顺侧(即,面对对电极的面)。

[0069] 现将参考附图,其中类似的数字始终是指类似的部分。应理解,本文中的数字和特性不一定按比例绘制。

[0070] 参考图1,可在与小孔密切相关(例如,结合可以是化学的、机械的、电的或电化学的)的测试下对分子进行典型的电测量。系统可在分子/孔复合物的两端施加刺激(电压或电流)并测量响应。为了隔离对孔/分子复合物的测量,一般利用高度绝缘的材料(例如,脂质双层)隔离小孔的两侧。

[0071] 绝缘阻挡层的相对侧上密封的体积根据目标种类(例如,核酸分子或标签分子)在检测过程中从顺侧移动至反侧的一般定义,被称为顺侧孔和反侧孔。反侧孔一般是与芯片电极接近并与之电连接的绝缘膜的一侧。

[0072] 图2显示具有温度控制的纳米孔生物芯片(或传感器)的实例,如可根据美国专利申请公布第2011/0193570号(其通过引用整体并入本文)中描述的方法制备的。参考图2,纳米孔检测器包含与导电溶液(例如,盐溶液)207接触的顶部电极201。底部导电电极202在纳米孔206附近、与其相邻或与其接近,所述纳米孔被插入在膜205中。可将膜205配置在小孔210上方,或直接在电极上方,其中传感器202形成小孔的表面的部分。在一些情况下,将底部导电电极202嵌入其中电路被嵌入半导体衬底204中的半导体203中。半导体203的表面可被处理为疏水性的。将被检测的分子穿过纳米孔206中的孔。将半导体芯片传感器置于封装208中,并且该封装又与温度控制元件209相邻。温度控制元件209可以是热电加热和/或冷却装置(例如,Peltier装置)。多个纳米孔检测器可形成纳米孔阵列。

[0073] 在一些实施方案中,所述生物芯片包含能够与小孔中的电极形成电路的对电极。在一些情况下,多个小孔中的多个电极共有共同的对电极。图3显示具有共同对电极的电极阵列,其中液体容器周边(例如,容器)用作对电极(例如,是导电的并且形成电路)。对电极的另一个实施方案示于图4中,其中对电极为在纳米孔的顶部上方的平板(例如,由导电金属制成)。如图5和图6中显示的,可将多个小孔中的多个电极组织成共享共同对电极的组中。在一些情况下,(例如,图6),多个小孔中的多个电极各自具有专用对电极。在一些情况下,具有多个对电极可允许个别感测电极,或仅少数感测电极与单个对电极配对,从而潜在地改善感测-对电极对的电响应和性能。

[0074] 在一些情况下,多个小孔(包括小孔的总数的任何亚组)包含共同的电解质池。如图7中显示的,小孔701可被壁702分成行,以使得成行的小孔在小孔的上方共有共同的电解质池。如此处所述将生物芯片分隔成部分可允许在单个生物芯片(例如,通过将不同样品置于芯片的不同部分中)上分析多个样品。

[0075] 纳米孔传感器可包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100或1000个与电极(例如,底部导电电极202)相邻的纳米孔(例如,溶血素或水通道蛋白等或其组合)。纳米孔传感器可包括仅供纳米孔传感器(而非其它传感器)使用的顶部电极(例如,顶部电极201),或作为另一选择,顶部电极可被提供来供多个纳米孔传感器使用。

[0076] 生物芯片加工

[0077] 控制表面特征、小孔腔体积以及电极组成和体积可以是开发用于纳米孔感测目的的可扩展的基于半导体的平面微孔阵列的主要挑战。在一些情况下,理想的基于纳米孔的

半导体阵列感测平台可实现以下目标：(1) 支持平面绝缘膜的芯片表面特征，(2) 导致良好界定的和良好受控的平面膜表面的差异化表面特征，(3) 大的反侧孔电解质体积，(4) 大的电极体积，(5) 阵列上相邻的传感器电极之间的低的电串扰，(6) 为了获得非常大的阵列大小的高的池密度，和(7) 在其过程中至关重要的参数(电压、电阻等)保持几乎恒定的极长的持续时间的稳定测量。

[0078] 例如，满足目标(1)和(2)可能非常困难，因为特别地可能必需确保利用良好受控的膜区域和反侧孔体积形成高度绝缘的(电阻性)阻挡层。

[0079] 在形成脂质双层膜的情况下，可调整芯片的设计和加工以产生疏水性(或亲脂性)表面和亲水性(或疏脂性)表面。芯片表面的小心控制允许良好界定的亲水和疏水区域被界定。这又可控制形成的脂质双层膜的结构和特征。

[0080] 目标(3)可以是重要的，以确保反侧孔电解质离子足够丰富，以在典型测量的持续时间过程中不影响结果。这可通过完全耗尽一种离子或另一种离子或使各种离子的相对浓度偏移至使得它们显著改变测量结果的程度(即，通过浓度梯度和所得的能斯特(Nernst)电位的偏移)来进行。

[0081] 目标(4)在牺牲电极的情况下可以是重要的，所述牺牲电极被消耗或转变为支持测量的电化学反应的部分(例如，银被转化成氯化银氧化反应)。具有高电极体积对于以下两个方面是重要的：(i) 增加可连续进行测量而无间插“再充电”测量的时间，所述间插“再充电”测量可完全破坏实验或导致测量的数据中的空缺，和(ii) 减小由氧化和还原电极组分的相对浓度的变化引起的电化学电位偏移。在一些情况下，电极材料(银)的完全耗尽设置了关于实际连续测量持续时间的理论上限。

[0082] 不幸地，这些目标中的几个目标可导致其中满足一个目标以牺牲另一个目标为代价的矛盾。例如，在硅表面蚀刻深腔和完全用银填充可在金属/硅表面上获得平面膜，从而实现目标(1)、(2)和(4)，然而未留下可用于反侧孔电解质的剩余体积。类似地，使电串扰最小化(目标5)可通过使相邻池相隔远离来实现；然而这以牺牲实现目标(6)为代价。

[0083] 在不同方面，所述生物芯片和用于制造本文所述的生物芯片的方法可以能够对核酸分子测序的方式实现目标(1)至(6)。例如，支持电解质和电极材料的深孔垂直腔结构的开发可满足目标(3)和(4)；混合湿/干法蚀刻可增加横向尺寸，从而反侧孔体积可满足目标(1)、(2)、(3)和(4)；氧化物表面的选择性硅烷化可实现目标(1)和(2)；凝胶的利用可用来自平衡目标(3)和(4)，而同时实现目标(1)和(2)；分布式对电极的实现可同时实现目标(5)和(6)；电极再补充(再充电)的使用可实现目标(7)；非牺牲电极的使用(当可行时)可实现目标(7)；电镀可增加电极材料，以满足目标(4)；或其任意组合。

[0084] 生物芯片特征

[0085] 在一个方面，生物芯片包含(a)半导体衬底；(b)一层配置在衬底上的二氧化硅，其中在二氧化硅内形成小孔；(c)涂覆小孔的内侧的抗腐蚀材料；(d)填充该小孔的某一部分(包括完全填充氧化物小孔)以与氧化物的表面共平面的小孔中的电极材料；和(e)涂覆二氧化硅的有机官能烷氧基硅烷层。在一些实施方案中，所述生物芯片还包含将小孔中的第一流体与小孔外部的第二流体隔绝的膜。还包括在本发明内的是通过本文所述的任何方法制造的生物芯片以及本文所述的任何生物芯片或通过本文所述的方法产生的生物芯片用于对聚合物(包括但不限于核酸分子)进行测序的用途。

[0086] 在一些情况下，电极材料在生物芯片的运行过程中未被耗尽。在一个方面，生物芯片包含多个具有配置于小孔上方的膜的小孔，和小孔中的能够检测响应于穿过孔的实体的通过膜中的孔的离子流动的变化的电极，其中所述电极在检测过程中未被耗尽。在一些实施方案中，所述电极与生物芯片的表面大体平齐，即，金属填充整个小孔。

[0087] 所述电极(例如，银或铂材料)可具有任何适当的质量或体积。在一些情况下，电极的体积为约0.1飞升(fL)、约0.5fL、约1fL、约5fL或约10fL。在一些情况下，电极的体积为至少约0.1飞升(fL)、至少约0.5fL、至少约1fL、至少约5fL或至少约10fL。在一些实施方案中，电极的体积为至多约0.1飞升(fL)、至多约0.5fL、至多约1fL、至多约5fL或至多约10fL。

[0088] 所述电极可由任何合适的材料制成，包括材料的混合物和合金。一些实例包括铂、银或其任意组合。在一些情况下，电极材料在电极运行过程中未被消耗。所述电极可包含具有至少两个氧化状态的材料和/或能够接受和供予电子的材料。

[0089] 具有深的紧密堆积的小孔的芯片

[0090] 在生物芯片上具有高密度的纳米孔传感器可能是具有小的装置和/或利用小的生物芯片装置感测大量分子或对其进行测序所期望的。所述表面包含任何合适的离散位点的密度(例如，适合用于在给定量的时间或给定的成本内对核酸样品进行测序的密度)。在一个实施方案中，所述表面具有大于或等于约500个位点/1mm²的离散位点的密度。在一些实施方案中，所述表面具有约100个、约200个、约300个、约400个、约500个、约600个、约700个、约800个、约900个、约1000个、约2000个、约3000个、约4000个、约5000个、约6000个、约7000个、约8000个、约9000个、约10000个、约20000个、约40000个、约60000个、约80000个、约100000个或约500000个位点/1mm²的离散位点的密度。在一些实施方案中，所述表面具有至少约200个、至少约300个、至少约400个、至少约500个、至少约600个、至少约700个、至少约800个、至少约900个、至少约1000个、至少约2000个、至少约3000个、至少约4000个、至少约5000个、至少约6000个、至少约7000个、至少约8000个、至少约9000个、至少约10000个、至少约20000个、至少约40000个、至少约60000个、至少约80000个、至少约100000个或至少约150000个位点/1mm²的离散位点的密度。

[0091] 具有高密度的离散位点的生物芯片一般导致具有小面积的小孔。在一些情况下，所述小孔具有适当的深度(例如，以使得小孔具有适当地大体积)。在一些情况下，所述小孔与芯片表面大体上共平面(即，金属填充整个小孔)。在一个方面，小孔的体积适当地大，以使得在将电极再充电之前，小孔中的离子浓度不被完全耗尽。在一个方面，所述电极可以是牺牲电极(例如，在检测过程中体积减小和/或增加的电极，诸如银)并且小孔的体积是适当地大的，以使得在对电极再充电之前电极未被完全耗尽。在一些实施方案中，所述小孔含有足够大体积的电极材料诸如银。在这些方面，除其它以外，小孔的体积可限制电极能够检测电流所持续的时间(即，在离子被耗尽和/或电极材料被耗尽之前)。

[0092] 在一些实施方案中，所述小孔具有适当地大体积，以使得电极可检测持续约50μs、约100μs、约150μs、约200μs、约250μs、约300μs、约350μs、约400μs、约450μs、约500μs、约550μs、约600μs、约650μs、约700μs、约750μs、约800μs、约850μs、约900μs、约950μs、约1ms、约5ms、约10ms、约50ms、约100ms、约500ms、约1s、约5s、约10s、约50s、约100s、约500s、约1000s或约5000s的离子流(例如，电流)。在一些实施方案中，所述小孔具有适当地大体积，以使得电极可检测持续至少约50μs、至少约100μs、至少约150μs、至少约200μs、至少约250μs、至少

约300μs、至少约350μs、至少约400μs、至少约450μs、至少约500μs、至少约550μs、至少约600μs、至少约650μs、至少约700μs、至少约750μs、至少约800μs、至少约850μs、至少约900μs、至少约950μs、至少约1ms、至少约5ms、至少约10ms、至少约50ms、至少约100ms、至少约500ms、至少约1s、至少约5s、至少约10s、至少约50s、至少约100s、至少约500s、至少约1000s或至少约5000s的离子流(例如,电流)。

[0093] 通过平衡跨电极施加的电位电压,和从而在双层孔的任一侧上再充电或重新分配离子,孔的数据采集寿命可被显著延长至10、20或48小时或更长时间。实例可以是在具有300mM KC1离子溶液,pH7.5的纳米孔系统中,跨双层孔施加+120mV,持续30秒,随后将电压降至-120mV,持续40秒。以该缓慢的开关DC方式重复循环,并且双层孔的顺侧和反侧的离子电荷分布保持平衡,以及在一个或多个银电极上存在的Ag和AgCl的组成也保持平衡。结果为长寿命数据采集孔检测器。可改变正和负电压的水平或量级以及花费在+或-极上的时间以适应盐或离子溶液浓度以及待使用的孔的类型。

[0094] 检测的时间可至少部分地取决于跨纳米孔和/或膜施加的电压的量级(例如,较高的电压量级导致较高的离子电流,较快的电极耗尽和因此相对较短的检测期)。在一些实施方案中,跨膜电压差为约0mV至约1V(正的或负的),例如,约40mV、约60mV、约80mV、约100mV、约120mV、约140mV、约160mV、约180mV、约200mV、约300mV、约400mV或约500mV。在一些实施方案中,跨膜电压差为至多约40mV、至多约60mV、至多约80mV、至多约100mV、至多约120mV、至多约140mV、至多约160mV、至多约180mV、至多约200mV、至多约300mV、至多约400mV或至多约500mV。在一些实施方案中,跨膜电压差为至少约0mV至约1V(正的或负的),例如,至少约40mV、至少约60mV、至少约80mV、至少约100mV、至少约120mV、至少约140mV、至少约160mV、至少约180mV、至少约200mV、至少约300mV、至少约400mV或至少约500mV。电压可以是恒定的或可变的(例如,随任意周期波形而变化)。

[0095] 在一些情况下,所述电极在至少约0mV至约1V(正的或负的),例如,约40mV、约60mV、约80mV、约100mV、约120mV、约140mV、约160mV、约180mV、约200mV、约300mV、约400mV或约500mV的施加的电位下具有至少约1分钟(“分钟”)、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时或12小时的工作寿命。在一些实例中,所述电极在约80mV的施加电位下具有至少约15分钟的工作寿命。

[0096] 电极的工作寿命可基于使用过程中电极的耗尽(例如,耗尽速率)来评估。在一些情况下,在电极使用过程中,所述电极材料在少于或等于约60分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟或1分钟的时间段内耗尽至多约50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.1%或0.01%。在一些实施方案中,在电极使用过程中,所述电极材料在少于或等于约60分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟或1分钟的时间段内未被耗尽。

[0097] 所述小孔可具有任何合适的深度。在一些情况下,从生物芯片的表面和/或膜的底部至电极的顶部和/或电极的底部测量小孔的深度。在一些情况下,小孔的深度大致等于氧化层的厚度(例如,图2中的203)。在一些实施方案中,小孔为约0.5微米(μm)、约1μm、约1.5μm、约2μm、约2.5μm、约3μm、约3.5μm、约4μm、约4.5μm、约5μm、约6μm、约7μm、约8μm、约9μm、约10μm或约20μm深。在一些实施方案中,小孔为至少约0.5微米(μm)、至少约1μm、至少约1.5μ

m、至少约2μm、至少约2.5μm、至少约3μm、至少约3.5μm、至少约4μm、至少约4.5μm、至少约5μm、至少约6μm、至少约7μm、至少约8μm、至少约9μm、至少约10μm或至少约20μm深。

[0098] 在一个方面,生物芯片包含多个具有配置于小孔上方的膜的小孔和小孔中的能够检测响应穿过孔的实体的通过膜中的孔的离子流动的变化的电极。生物芯片可包含至少500个小孔/平方毫米,并且所述小孔可具有适当地大体积,以使得所述电极可检测至少100个实体而对电极再充电。

[0099] 在一些实施方案中,所述实体是在核苷酸掺入事件过程中被检测的标签分子。在一些情况下,聚合物穿过孔并且实体为聚合物的亚单位。在一些情况下,所述聚合物是核酸并且聚合物的亚单位为核碱基。

[0100] 所述生物芯片可检测任何适当数目的实体而对电极再充电。在一些情况下,检测到约10、约50、约100、约500、约1000、约5000、约10000、约50000、约100000、约500000、约1000000、约5000000或约10000000个实体。在一些情况下,检测到至少约10、至少约50、至少约100、至少约500、至少约1000、至少约5000、至少约10000、至少约50000、至少约100000、至少约500000、至少约1000000、至少约5000000或至少约10000000个实体。

[0101] 具有紧密堆积的小孔和最低串扰的芯片

[0102] 在一个方面,所述小孔被紧密堆积并且具有少量的串扰(例如,所述电极从最靠近电极的纳米孔和/或膜导出全部或大部分它们的信号)。在一个方面,生物芯片包含多个具有配置于小孔上方的膜的小孔和小孔中的检测响应于离子流动的信号的电极,其中所述生物芯片包含至少500个孔/平方毫米并且电极彼此电分离。所述生物芯片可包含如本文所述的每区域任何适当数目的小孔。

[0103] 在一些实施方案中,所述电极检测到约80%、约90%、约95%、约99%、约99.5%或约99.9%的来自通过膜中的纳米孔的离子流动的其信号。在一些情况下,所述电极检测到至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、至少约99.5%或至少约99.9%的来自通过膜中的纳米孔的离子流动的其信号。在一些情况下,电极检测到不超过20%、不超过10%、不超过5%、不超过1%、不超过0.5%或不超过0.1%的来自通过相邻小孔中的纳米孔的离子流动的其信号。

[0104] 用于制造生物芯片的方法

[0105] 某些方法可用于制造,除其它以外,能够经受腐蚀性溶液,并在生物芯片上形成具有高电阻率的膜的高质量生物芯片。在一个方面,用于制备生物芯片的方法包括:提供半导体衬底和在衬底上或衬底附近形成多个含有能够进行电测量的电极的小孔,其中所述方法还包括:(a)处理该衬底以经受住腐蚀性溶液;和(b)制备衬底以形成以高电阻率密封孔的膜。

[0106] 所述膜可具有任何适当地高电阻率。在一些情况下,电阻率为约10兆欧姆(MΩ)、约50MΩ、约100MΩ、约500MΩ、约1吉欧姆(GΩ)、约5GΩ或约10GΩ。在一些情况下,电阻率为至少约10兆欧姆(MΩ)、至少约50MΩ、至少约100MΩ、至少约500MΩ、至少约1吉欧姆(GΩ)、至少约5GΩ或至少约10GΩ。

[0107] 在一些实施方案中,所述半导体衬底包含硅。在一些情况下,所述膜是脂质双层。所述电极可以能够测量通过嵌入膜的纳米孔的离子电流流动。

[0108] 所述装置可经受任何合适的腐蚀性溶液。在一些情况下,所述腐蚀性溶液是水溶

液(包括水)并包括离子(例如,Na⁺、Cl⁻)。在一些情况下,所述生物芯片在与1M NaCl接触许多周后是可操作的。

[0109] 在一个方面,用于制备生物芯片的方法包括:(a)将具有活性氧化物基团的材料沉积在半导体衬底上;(b)将小孔蚀刻至二氧化硅中;(c)在所述小孔中形成金属电极;(d)除小孔外从衬底的所有区域除去金属;和(e)用适合于膜粘附的层涂覆衬底。在一些情况下,所述半导体衬底包含硅。所述方法可制备用于使用纳米孔进行核酸测序的生物芯片。

[0110] 在一些实施方案中,(a)中的材料为二氧化硅。所述材料可呈现硬的平面表面,所述表面表现出活性氧化物(-OH)基团对与其表面接触的溶液的均一覆盖。这些氧化物基团可以是用于随后硅烷化过程(e)的附着位点。或者,可沉积模拟二氧化硅的蚀刻特征的亲脂性和疏水性表面材料。

[0111] 在一些实施方案中,将钝化层沉积在(a)中的半导体衬底上,所述半导体衬底可具有或可以不具有活性氧化物基团。所述钝化层可包含氮化硅(Si₃N₄)或聚酰亚胺。在一些情况下,光刻操作用于确定其中膜在钝化层上形成的区域。

[0112] 图8至图20显示可导致生物芯片的操作的实例。所有图不一定按比例绘制。

[0113] 参考图8,用于产生生物芯片的方法可始于半导体衬底。半导体(例如,硅)可具有配置在其上的任何数目的层,包括但不限于导电层诸如金属。所述导电层在一些情况下是铝。在一些情况下,所述衬底具有保护层(例如,氮化钛)。可借助于各种沉积技术,诸如,例如如下方法来沉积所述层:化学气相沉积(CVD)、原子层沉积(ALD)、等离子体增强CVD(PECVD)、等离子体增强ALD(PEALD)、金属有机CVD(MOCVD)、热丝CVD(HWCVD)、初始化CVD(iCVD)、改进的CVD(MCVD)、气相轴沉积(VAD)、外部气相沉积(OVD)和物理气相沉积(例如,溅射沉积、蒸发沉积)。

[0114] 在一些情况下,将氧化物层沉积在如图9中所示的半导体衬底上。在一些情况下,所述氧化物层包含二氧化硅。可使用原硅酸四乙酯(TEOS)、高密度等离子体(HDP)或其任意组合来沉积二氧化硅。

[0115] 在一些情况下,使用低温技术来沉积二氧化硅。在一些情况下,所述过程是二氧化硅的低温化学蒸气沉积。所述温度通常足够低,以使得芯片上预先存在的金属不被破坏。沉积温度可为约50℃、约100℃、约150℃、约200℃、约250℃、约300℃、约350℃等。在一些实施方案中,沉积温度低于约50℃、低于约100℃、低于约150℃、低于约200℃、低于约250℃、低于约300℃、低于约350℃等。在任何适当的压力下进行沉积。在一些情况下,所述沉积过程使用RF等离子体能。

[0116] 在一些情况下,所述氧化物不通过热生长的氧化物法(例如,其可使用接近或超过1,000℃的温度)来沉积。

[0117] 可将二氧化硅沉积至适合于小孔形成的厚度,所述小孔包含电极和一定体积的能够对核酸分子的至少100个、至少1000个、至少10000个、至少100000个或至少1000000个核碱基进行测序而无需对电极再充电的电解质。

[0118] 可将二氧化硅沉积至任何合适的厚度。在一些实施方案中,所述二氧化硅为约0.5微米(μm)、约1μm、约1.5μm、约2μm、约2.5μm、约3μm、约3.5μm、约4μm、约4.5μm、约5μm、约6μm、约7μm、约8μm、约9μm、约10μm或约20μm厚。在一些实施方案中,所述二氧化硅为至少约0.5微米(μm)、至少约1μm、至少约1.5μm、至少约2μm、至少约2.5μm、至少约3μm、至少约3.5μm、至少

约4μm、至少约4.5μm、至少约5μm、至少约6μm、至少约7μm、至少约8μm、至少约9μm、至少约10μm或至少约20μm厚。

[0119] 小孔的蚀刻

[0120] 可使用各种制造技术在二氧化硅衬底上产生小孔。此类技术可包括半导体制造技术。在一些情况下，使用光刻技术诸如半导体工业中使用的那些技术来产生小孔。例如，可将光致抗蚀剂（例如，当暴露于电磁辐射时改变性质的材料）涂覆在二氧化硅上（例如，通过晶片的旋涂）至任何合适的厚度，如图10中显示的。随后将包含光致抗蚀剂的衬底暴露于电磁辐射源。可将掩模用于屏蔽来自部分光致抗蚀剂的辐射，以界定小孔的区域。所述光致抗蚀剂可以是负性抗蚀剂或正性抗蚀剂（例如，可将小孔的区域暴露于电磁辐射或可将除小孔外的区域暴露于电磁辐射，如通过掩模界定的）。在图11中，将覆盖其中将产生小孔的位置的区域暴露于电磁辐射以确定对应于二氧化硅层中的小孔的位置和分布的图案。可将光致抗蚀剂通过确定对应于小孔的图案的掩模暴露于电磁辐射。随后，诸如，例如借助于洗涤操作（例如，2%的TMAH（四甲基氢氧化铵）溶液或本领域技术人员已知的其它溶液）除去光致抗蚀剂的暴露部分。随后可将掩模的去除部分暴露于化学蚀刻剂以蚀刻衬底并将小孔的图案转移至二氧化硅层。蚀刻剂可包括酸，诸如，例如，硫酸（H₂SO₄）。可以以各向异性方式蚀刻二氧化硅层，尽管在一些情况下，蚀刻可为各向同性的。例如，参考图13，不完全对应于最终的小孔的区域的区域可被蚀刻（例如，可在光致抗蚀剂下蚀刻小孔）。

[0121] 各种蚀刻方法可用于蚀刻其中将形成小孔的区域中的二氧化硅。如在图12和图13中所示，所述蚀刻可为各向同性蚀刻（即，沿一个方向的蚀刻速率与沿正交方向的蚀刻速率相等），或各向异性蚀刻（即，沿一个方向上的蚀刻速率小于沿正交方向上的蚀刻速率），或其变体。

[0122] 在一些情况下，各向异性蚀刻除去大部分小孔的体积。可除去任何适当的百分比的小孔体积，包括约60%、约70%、约80%、约90%或约95%。在一些情况下，在各向异性蚀刻中除去至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的材料。在一些情况下，在各向异性蚀刻中除去至多约60%、至多约70%、至多约80%、至多约90%或至多约95%的材料。在一些实施方案中，所述各向异性蚀刻不除去一直向下延伸至半导体衬底的二氧化硅材料。各向同性蚀刻在一些情况下除去一直向下延伸至半导体衬底的二氧化硅材料。

[0123] 在一些情况下，使用光刻操作蚀刻小孔以确定小孔，随后进行混合干-湿法蚀刻。所述光刻操作可包括用光致抗蚀剂涂覆二氧化硅和将光致抗蚀剂通过具有确定小孔的图案的掩模（或掩膜（reticle））暴露于电磁辐射。在一些情况下，混合干-湿法蚀刻包括：(a)通过光刻操作除去在光致抗蚀剂中确定的小孔区域中的大多数二氧化硅的干法蚀刻；(b)清洁生物芯片；和(c)从小孔区域中的衬底除去剩余二氧化硅的湿法蚀刻。

[0124] 可借助于等离子体蚀刻化学或暴露于氧化剂诸如例如H₂O₂、O₂或O₃来清洁生物芯片。所述清洁可包括除去残留聚合物，除去可阻断湿法蚀刻的材料或其组合。在一些情况下，所述清洁为等离子体清洁。所述清洁操作可进行任何合适的时间段（例如，15至20秒）。在一个实例中，可利用Applied Materials eMAX-CT机器以100mT、200W、20G、2002的设置进行清洁20秒。

[0125] 干法蚀刻可以是垂直地（例如，朝向半导体衬底）但非侧面地（例如，与半导体衬底

平行)蚀刻的各向异性蚀刻。在一些情况下,所述干法蚀刻包括利用基于氟的蚀刻剂诸如CF₄、CHF₃、C₂F₆、C₃F₆或其任意组合的蚀刻。在一种情况下,利用具有100mT、1000W、20G和50CF₄的设置的Applied Materials eMax-CT机器进行蚀刻400秒。

[0126] 所述湿法蚀刻可以是在所有方向中除去材料的各向同性蚀刻。在一些情况下,所述湿法蚀刻底切光致抗蚀剂。底切光致抗蚀剂可使光致抗蚀剂在以后的操作中更容易除去(例如,光致抗蚀剂“剥离”)。在一个实施方案中,所述湿法蚀刻是缓冲氧化物蚀刻(BOE)。在一些情况下,在室温下利用氢氟酸基质进行湿法氧化物蚀刻,可将所述氢氟酸基质缓冲(例如,利用氟化铵)以减缓蚀刻速率。蚀刻速率可取决于待蚀刻的薄膜以及HF和/或NH₄F的具体浓度。完全除去氧化物层所需的蚀刻时间通常凭经验来测定。在一个实例中,在22°C利用15:1BOE进行蚀刻(缓冲氧化物蚀刻)。

[0127] 可蚀刻二氧化硅层至底下的材料层。例如,参考图13,蚀刻二氧化硅层直至氮化钛层。

[0128] 在一个方面,用于制备生物芯片的方法包括使用(a)确定小孔的光刻操作;(b)除去通过光刻操作确定的小孔区域中的大多数二氧化硅的干法蚀刻;和(c)从小孔区域中的衬底除去剩余二氧化硅的湿法蚀刻来将小孔蚀刻至涂覆至半导体衬底上的二氧化硅层中。在一些情况下,所述方法还包括除去残留聚合物、除去可阻断湿法蚀刻的材料、或其组合。所述方法可包括等离子体清洁操作。

[0129] 如图13中显示的,在某些情况下在光刻操作或混合湿-干法蚀刻后,未从二氧化硅除去光致抗蚀剂。留下光致抗蚀剂可在以后的操作中用于引导金属仅进入小孔中而不至二氧化硅的上表面上。在一些情况下,用金属(例如,图13中的铝)涂覆半导体衬底,并且所述湿法蚀刻不除去保护金属免于腐蚀的组分(例如,图13中的氮化钛(TiN))。然而,在一些情况下,可利用湿法化学诸如SPM(硫酸/过氧化物混合物)或有机溶剂来除去光致抗蚀剂层。在其它实施方案中,可利用氧等离子体来除去光致抗蚀剂层。

[0130] 电极金属化

[0131] 本文所述的生物芯片可用于借助纳米孔和电检测来检测分子和/或对核酸分子进行测序。可借助于小孔中的电极和位于小孔外部的对电极进行电检测。本文中提供了用于产生电极诸如金属电极的方法。所述电极可在检测过程中被可逆地消耗,在检测过程中不被消耗,或在检测过程中被不明显地消耗。

[0132] 可在分子检测过程中被可逆地消耗的电极的实例为银。可在检测过程中被不明显地消耗的电极的实例为铂。

[0133] 可借助于各种沉积技术形成与衬底相邻的电极。例如,可借助于电镀形成电极。作为另一个实例,可借助于蒸气沉积技术诸如,例如以下技术来形成电极:化学气相沉积(CVD)、原子层沉积(ALD)、等离子体增强CVD(PECVD)、等离子体增强ALD(PEALD)、金属有机CVD(MOCVD)、热丝CVD(HWCVD)、初始化CVD(iCVD)、改进的CVD(MCVD)、气相轴沉积(VAD)、外部气相沉积(OVD)和物理气相沉积(例如,溅射沉积、蒸发沉积)。

[0134] 在一个方面,用于制备生物芯片的方法包括(a)提供利用一层二氧化硅涂覆的半导体衬底,其中将小孔蚀刻至二氧化硅中(例如,如图13中显示的);(b)将保护层沉积在小孔表面(例如,氮化钛或铂,如图15中显示的)上;和(c)将电极材料沉积在小孔表面(例如,如图16中显示的银)上。所述方法还可包括将粘附材料的薄膜沉积至小孔表面上以为金属

层下面的层提供金属层的附着和导电性。所述粘附材料可以包括钛、钽、氮化钛(TiN)、铬或其任意组合。参考图14,将包含钛的粘附材料相邻地沉积于氮化钛层,诸如,例如,通过电镀或气相沉积(例如,化学气相沉积)。在一些情况下,单金属层取代两个或更多个层(例如,单金属层为粘附层和保护层二者)。

[0135] 在一些情况下,所述保护层包含抗腐蚀金属(例如,铂、金)。无限制地,保护层可(i)为下层导体(例如,为图14中的铝,或氮化钛)供电连通,(ii)保护下层导体免受反应性溶液(例如,腐蚀性溶液诸如氯化钠水溶液)攻击,(iii)提供电子源和/或吸收器(sink),以使得电极材料在氧化还原反应中不被消耗(例如,当电极包含银时,铂可以充当源和/或吸收器),或(iv)其任意组合。

[0136] 金属的各个层(例如,粘附层、保护层、电极材料等)可通过任何合适的技术诸如溅射、沉积、电镀或其组合来进行沉积。在一些情况下,所述电极材料通过溅射,诸如,例如,磁控溅射来沉积。

[0137] 所述电极能够根据需要对生物芯片的运行作出任何适当的测量。在一些情况下,电极材料对小孔中的分析物进行电测量。所述分析物可包括核酸、氨基酸、蛋白质、标签分子或其任意组合。电测量可以是可逆的氧化还原反应。在一些实施方案中,将足够体积的电极材料沉积至小孔中以提供小孔中的牵涉分析物的氧化还原反应的检测。

[0138] 剥离方法

[0139] 在电极金属化后可存在一层或多层沉积至光致抗蚀剂上的金属,如图16中显示的。在一些情况下,从生物芯片除去沉积至光致抗蚀剂上的金属,然而沉积在小孔中的金属保留在小孔中。在小孔产生后留下光致抗蚀剂(例如,如图13中显示的)对于实现只从生物芯片的表面而非小孔除去金属可以是有利的。

[0140] 在一些情况下,在形成小孔和电极后,如果需要,可省略所述光致抗蚀剂并且可借助于化学机械抛光和随后的湿法或反应离子蚀刻(RIE)来除去电极小孔外的金属。在一个实例中,将CMP用于去除芯片表面上的电极金属堆叠,同时其仍保留在孔中(镶嵌工艺)。在另一实例中,使用丙酮或另一种抗蚀剂溶剂除去光致抗蚀剂和任何覆盖层(剥离工艺)。

[0141] 生物芯片表面的硅烷化

[0142] 在形成小孔和小孔内的电极后,可处理二氧化硅层以使得二氧化硅层适合用于在小孔中或小孔的邻近形成膜。在一些情况下,在小孔上方形成疏水膜,诸如,例如,双层(例如,脂质双层)。所述膜可以将蚀刻的小孔与覆盖液体隔离,诸如,例如,具有至少约10吉欧姆的电阻率。如本文中所述,二氧化硅表面的硅烷化(例如,以使表面疏水)使表面适于膜的形成。

[0143] 用于将膜稳定至半导体界面的方法包括使半导体表面硅烷化,使得膜能够粘附于硅烷化的表面并将第一流体(例如,在膜的顺侧上)与第二流体(例如,在膜的反侧上)分离,所述膜具有例如至少约10吉欧姆的电阻率。

[0144] 用于制备生物芯片的方法可包括:(a)提供封装的生物芯片或具有包含二氧化硅和/或金属的表面的生物芯片前体(例如,如在图17中显示的);和(b)使用,例如,有机官能烷氧基硅烷分子使表面硅烷化(例如,如图18中显示的)。在一些情况下,所述有机官能烷氧基硅烷分子是二甲基氯-十八烷基-硅烷、二甲基甲氧基-十八烷基-硅烷、甲基二氯-十八烷基-硅烷、三氯-十八烷基-硅烷、三甲基-十八烷基-硅烷、三乙基-十八烷基-硅烷或其任意

组合。

[0145] 有机官能烷氧基硅烷分子可覆盖二氧化硅表面(如图18中显示的)。该硅烷层的厚度可以为一个分子(图18)。

[0146] 在硅烷化后,所述方法还可包括利用漂洗方案从衬底除去残余硅烷。示例性漂洗方案是利用癸烷、丙酮、乙醇、水和乙醇漂洗5秒,随后进行空气干燥,并在97°C加热30分钟。所述漂洗方案也可用于在应用硅烷层之前清洁芯片。

[0147] 图21显示银和底下的保护金属可溅射至所述小孔的侧壁上,从而硅烷化可以不一直下至小孔内。在一些情况下,3/4或更多的小孔的侧壁被银和底下的保护层覆盖。

[0148] 双层的形成

[0149] 本文所述的是用于在电极(例如,单独受控的)阵列上产生组成半导体纳米孔传感器芯片的脂质双层和纳米孔的方法。所述芯片可用于测定聚合物序列,诸如核酸序列,或任何标记分子的存在。

[0150] 本文中描述了用于在半导体传感器芯片上的电极阵列上方形成脂质双层的技术。在一个实施方案中,将包含脂质分子的液体插入至所述芯片的表面。所述液体可被气泡隔开。脂质分子可以分布在表面上,并且气泡使得脂质变薄,从而在每个电极上方自发形成脂质双层。可以向电极施加额外的电刺激,以促进双层的形成。可以进一步向沉积的脂质的顶部施加含有纳米孔蛋白的溶液。更多的气泡可以在芯片上翻滚,以促进纳米孔向双层内的插入。这些技术可以在具有或不具有流动池的情况下进行。在某些情况下,可以施加额外的刺激以诱导双层或孔的生成。此类刺激可包括压力、超声处理和/或声脉冲。刺激可包括针对传感器芯片的缓冲液(约5.0至约8.5的pH范围)、离子溶液(例如,NaCl、KCl;约75mM至约1M)、气泡、化学物质(例如,己烷、癸烷、十三烷等)、物理运动、电刺激或电刺激脉冲、压力或压力脉冲、温度或温度脉冲、超声脉冲和或声脉冲的任意组合。

[0151] 如图22中所示,气泡2205可以是大的并且保持与多个孔2210相邻,每一个孔2210含有电极。所述气泡可替换来自与电极相邻的区域的脂质,以产生(a)覆盖电极的脂质双层。在一些情况下,将气泡的边缘与脂质溶液2215接触,并且一些脂质溶液在气泡2205的下方2220扩散以形成一个或多个覆盖孔2210和电极的脂质双层。所述气泡可以是气体(或蒸汽)气泡。所述气泡可包含单一气体或气体诸如,例如,空气、氧气、氮气、氩气、氦气、氢气或二氧化碳的组合。图30还提供了双层形成方法的另一个举例说明,如本文中提供的。

[0152] 气泡可覆盖任何适当数目的电极和/或与所述电极相邻。在一些情况下,所述气泡与约100个、约1000个、约10000个、约100000个、约1000000个或约10000000个电极相邻。在一些情况下,所述气泡与至少约100个、至少约1000个、至少约10000个、至少约100000个、至少约1000000个或至少约10000000个电极相邻。

[0153] 所述气泡可保持与电极相邻持续任何合适的时间段(例如,长至足以形成脂质双层)。在一些情况下,将所述气泡保持与电极相邻,持续约10ms至约10分钟,例如,0.5秒(s)、约1s、约3s、约5s、约10s、约20s、约30s、约45s、约60s、约1.5分钟(min)、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟或约10分钟。在一些情况下,将所述气泡保持与电极相邻,持续至少约0.5秒(s)、至少约1s、至少约3s、至少约5s、至少约10s、至少约20s、至少约30s、至少约45s、至少约60s、至少约1.5分钟(min)、至少约2分钟、至少约3分钟、至少约4分钟、至少约5分钟或至少约10分钟。在一些情况下,将所述气泡保持与电极相邻,持续至多约0.5秒(s)、至多约1s、

至多约3s、至多约5s、至多约10s、至多约20s、至多约30s、至多约45s、至多约60s、至多约1.5分钟(min)、至多约2分钟、至多约3分钟、至多约4分钟、至多约5分钟或至多约10分钟。在一些情况下，将所述气泡保持与电极相邻，持续约1s至约10分钟、约10s至约5分钟或约30s至约3分钟。

[0154] 在一个方面，用于形成用于纳米孔感测装置的脂质双层的方法包括提供包含与多个感测电极流体连通的流体流路的预处理的芯片，和使脂质溶液流入流体流路以及使气泡流至流体流路上，从而形成与每一个感测电极相邻的脂质双层。如本文中所用，预处理的芯片是已使KCl或离子溶液初始流过芯片上方并填充所有小孔或通道的芯片。图7显示具有两个流体流路的装置的实例，且图24显示具有5个流体流路的装置的实例。在一些实施方案中，气泡横跨多个感测电极，并且与感测电极相邻，持续至少约1秒。气泡可与感测电极或含有感测电极的小孔相邻，持续至少约10ms至约10分钟之间，例如5秒、至少约10秒、至少约30秒和/或至多约1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟或10分钟。在一些情况下，将纳米孔插入与每一个感测电极相邻的脂质双层。

[0155] 在一个方面，用于形成用于纳米孔感测装置的脂质双层的方法包括提供包含与多个感测电极流体连通的流体流路的预处理的芯片，使气泡流至流体流路上，其中所述气泡横跨多个感测电极和将气泡的周边与脂质接触。所述脂质可在气泡下方扩散并扩散至流体流路上(例如，从而形成与每一个感测电极相邻的脂质双层)。在一些情况下，所述方法还包括将纳米孔插入与每一个感测电极相邻的脂质双层。

[0156] 可将所述气泡与脂质接触，持续任何合适的时间段(例如，长至足以形成脂质双层)。在一些情况下，将气泡与脂质接触持续约0.5秒(s)、约1s、约3s、约5s、约10s、约20s、约30s、约45s、约60s、约1.5分钟(min)、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟或约10分钟。在一些情况下，与脂质接触持续至少约0.5秒(s)、至少约1s、至少约3s、至少约5s、至少约10s、至少约20s、至少约30s、至少约45s、至少约60s、至少约1.5分钟(min)、至少约2分钟、至少约3分钟、至少约4分钟、至少约5分钟或至少约10分钟。在一些情况下，将所述气泡与脂质接触，持续至多约0.5秒(s)、至多约1s、至多约3s、至多约5s、至多约10s、至多约20s、至多约30s、至多约45s、至多约60s、至多约1.5分钟(min)、至多约2分钟、至多约3分钟、至多约4分钟、至多约5分钟或至多约10分钟。在一些情况下，将所述气泡与脂质接触，持续约1s至约10分钟之间、约10s至约5分钟之间或约30s至约3分钟之间。

[0157] 所述方法可在电极的任何部分上方形成脂质双层。在一些情况下，在至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%的感测电极的上方形成脂质双层。在一些实例中，在约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%或约100%的感测电极上方形成脂质双层。

[0158] 所述双层可在脂质双层的顺侧上的溶液与双层的反侧上的溶液之间提供电阻。在一些情况下，所述电阻为约100兆欧姆(MΩ)、约500MΩ、约1吉欧姆(GΩ)、约10GΩ或约100GΩ。在一些情况下，所述电阻为至少约100兆欧姆(MΩ)、至少约500MΩ、至少约1吉欧姆(GΩ)、至少约10GΩ或至少约100GΩ。在一些实施方案中，所述电阻为约1垓欧姆(TΩ)。

[0159] 插入纳米孔可包括通过电极施加电刺激(例如，电压脉冲或电流脉冲)以有利于纳米孔在脂质双层中的插入。作为替代，或除此以外，可通过对传感器芯片施加一个或多个其

它刺激,诸如,例如,压力脉冲,或缓冲液(约5.0至约8.5的pH范围)、离子溶液(例如,NaCl、KCl;约75mM至约1M)、气泡、化学物质(例如,己烷、癸烷、十三烷等)、物理运动、电刺激或电刺激脉冲、压力或压力脉冲、温度或温度脉冲、超声脉冲和或声脉冲的任意组合来插入纳米孔。所述纳米孔可以是任何纳米孔(例如,蛋白质纳米孔)。在一些实施方案中,所述纳米孔为耻垢分枝杆菌孔蛋白A(MspA)、 α -溶血素、与耻垢分枝杆菌孔蛋白A(MspA)或 α -溶血素中的至少一个具有至少70%同源性的任何蛋白质,或其任意组合。

[0160] 在一些情况下,跨所述双层的电阻在纳米孔插入后减小。在纳米孔插入后双层可在脂质双层的顺侧上的溶液与双层的反侧上的溶液之间提供电阻。在一些情况下,纳米孔插入后的电阻为约1兆欧姆($M\Omega$)、约10 $M\Omega$ 、约100 $M\Omega$ 、约500 $M\Omega$ 、约1吉欧姆($G\Omega$)。在一些情况下,纳米孔插入后的电阻为至多约1兆欧姆($M\Omega$)、至多约10 $M\Omega$ 、至多约100 $M\Omega$ 、至多约1000 $M\Omega$ 、至多约500 $M\Omega$ 、至多约1吉欧姆($G\Omega$)。

[0161] 所述脂质可以为任何合适的脂质或脂质的混合物。在一些情况下,所述脂质参与有机溶剂。在一些实施方案中,脂质选自由以下组成的组:二植烷酰基磷脂酰胆碱(DPhPC)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、溶血磷脂酰胆碱(LPC)、1,2-二-0-植烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DoPhPC)、棕榈酰基-油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、二油酰基-磷脂酰甲酯(DOPME)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、鞘磷脂、1,2-二-0-植烷基-sn-甘油;1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-350];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-550];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-750];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-1000];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000];1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-乳糖基;GM1神经节苷脂、或其任意组合。

[0162] 在一个方面,用于形成用于纳米孔传感器的脂质双层的方法,包括将缓冲溶液引导至流动通道,所述流动通道包含其上具有材料层的电极(或含有电极的小孔)。所述缓冲溶液可以是导电的,并且所述材料层可以包含一种或多种脂质。随后,可将所述缓冲液与材料层接触,并且可向电极施加一个或多个电压,以促进双层形成。随后,可测量通过所述电极的电流,以确定材料层的至少一部分是否已覆盖并密封所述电极和/或在所述电极的全部或一部分上方形成双层。施加的电压可能足以破坏电极上方的双层密封,并且引起短路电流。基于关于材料层的至少一部分是否已覆盖并密封电极和/或已在电极的全部或一部分上方形成双层的确定,可以同时向所有电极、电极组或独立电极施加刺激,以诱导材料层的至少一部分形成与所述电极相邻的脂质双层。

[0163] 在一些实施方案中,所述刺激包括以下中的至少一个:在电极阵列表面上方的液体流、在阵列表面上方的一种或多种不同液体的连续流、在阵列表面上方的一种或多种不同液体和气泡的任意组合的连续流、电脉冲、超声脉冲、压力脉冲或声脉冲。在一些实施方案中,所述刺激包括缓冲液(约5.0至约8.5的pH范围)、离子溶液(例如,NaCl、KCl;约75mM至约1M)、气泡、化学物质(例如,己烷、癸烷、十三烷等)、物理运动、电刺激或电刺激脉冲、压力或压力脉冲、温度或温度脉冲、超声脉冲和或声脉冲的任意组合。在一些情况下,材料层包含至少两种类型的脂质。在一些实例中,所述刺激包含阵列表面上方的一种或多种液体和气泡的连续流。

[0164] 在一个方面,本文描述了用于在构成单独控制的电极的阵列的多个电极中每个电极的顶部生成脂质双层的自动化方法,以及向半导体传感器上单独控制的电极的阵列中每个电极顶部的每个双层内插入单个孔的方法。通过向紧密靠近基本平整的表面上的电极的脂质层施加适当的外部刺激(例如,电刺激、压力刺激、超声刺激或声刺激),可以诱导在电极阵列中的电极上方形成双层。此外,通过向在一个或多个电极上具有脂质双层并且由含有纳米孔蛋白的溶液覆盖的整个传感器芯片的单个电极上施加适当的外部刺激(例如,包括电刺激、压力刺激、超声刺激或声刺激),可以诱导向双层内插入孔。结果是,响应于刺激并且以确定的方式,在单独控制的电极的阵列中的多个电极上方自动生成双层,而无需手动干预。在某些情况下,单个纳米孔能够响应于刺激并且以确定的方式插入多个电极/双层中,并因此生成单独控制的电纳米孔传感器的高度平行的阵列。这些单独控制的纳米孔传感器的阵列可以在基本平整的半导体表面上产生,并且在所述半导体材料内部,产生操作和控制单个电极所需的电路的一部分或全部。

[0165] 除了上述产生双层和孔的方法,本公开还提供了在单独控制的电/纳米孔传感器的阵列上产生双层和孔的经济和相对简单的方法,所述方法包括:1)活化已经存在于(预先施加于)传感器上的脂质或脂质-孔蛋白蛋白混合物,并且导致自发的双层形成或双层-孔形成;2)活化已经存在于(预先施加于)传感器上的脂质或脂质-孔蛋白蛋白混合物,并且通过在电极处的电刺激而直接生成双层和或孔,或通过对系统的刺激而生成双层和或孔;3)活化已经存在于(预先施加于)传感器上的脂质或脂质-孔蛋白蛋白混合物,并且通过使气泡与传感器芯片表面接触或使气泡穿过传感器芯片表面而直接生成双层和或孔;4)活化已经存在于(预先施加于)传感器上的脂质或脂质-孔蛋白蛋白混合物,并且使用气泡在传感器阵列表面上分布混合物或使之变薄,该处理为后续的在电极处的电刺激或对系统的刺激准备好表面,以生成双层和或孔;5)使用气泡以将脂质混合物施加、分布于传感器阵列的表面上并使之变薄,以使得在阵列中的多个独立电极上方产生双层;6)使用气泡以施加、分布脂质混合物并使之变薄,并准备用于后续的在电极处的电刺激或对系统的刺激的表面,以在多个电极上方产生双层;7)使用气泡,以将孔蛋白蛋白混合物施加、分布于利用脂质混合物制备的传感器阵列的表面上并使之变薄,使得在阵列中的多个独立电极上方插入孔;8)使用气泡,以施加、分布孔蛋白蛋白混合物并使之变薄,并且准备用于后续的在电极处的电刺激或对系统的刺激的表面,以在阵列的多个电极上方生成单个孔;9)使用电刺激在电极的表面上方生成双层,而不需要在电极的表面上方产生或施加气泡;10)使用施加于一个或多个电极或整个传感器芯片上的超声或压力刺激,以在一个电极或多个电极的表面上方生成双层和/或孔;11)提高用于纳米孔电感测的电极半导体阵列上的电极密度的方法,该方法与上述建立双层及孔的方法相匹配;12)使用这样的设置,在所述设置中在包含多个电极-纳米孔传感器的阵列的开放式单一传感器芯片上不存在流动池能够支持上文中或本文中其它处的方法,或者,在包含多个电极-纳米孔传感器的阵列的单一传感器芯片上存在一个流动池能够支持上文中或本文的其它处的方法,或者,在包含多个电极-纳米孔传感器的阵列的单一传感器芯片上存在多个流动池能够支持上文中或本文中的其它处的方法;13)改变液体或气泡的压力,以改善成功的双层或孔的产生;及14)改变传感器芯片和液体的温度,以改善双层或孔的生成。

[0166] 本公开提供了各种产生脂质双层以及向双层中插入孔的方法。在一个实施方案

中,提出了一种具有多个电极的半导体芯片。将一种液态的脂质溶液施加于经硅烷化制备的芯片表面。所述液态脂质溶液可以是有机溶剂,例如,己烷、癸烷、十三烷等,以及脂质分子诸如二植烷酰基磷脂酰胆碱(DPhPC)和/或任何上述脂质的溶液。所述溶液可通过流动、倾倒、喷涂和/或涂刷的方式施加于表面上。所述溶液在表面上干燥。所述溶液可以大体上或完全干燥,使得只有粉末形式的DPhPC分子得以保留。作为另一选择,所述溶液可以干燥至粘性状态。这样,芯片的表面可被呈粉末形式或粘性溶液形式的预施加的脂质分子官能化。所述芯片被密封,并且可以被处理和运输。

[0167] 所述半导体芯片可以含有盖,并且所述盖可使得使用者可以将液体泵入和泵出(或以其它方式引导液体的移动)所述芯片。在一些实例中,使用者向芯片内施加缓冲液体(或溶液),诸如盐水,以激活脂质分子,所述脂质分子可以呈干燥或大体上干燥的状态。一旦脂质分子与缓冲溶液接触,脂质分子即被水合。进入的缓冲液体的压力可以促进在每个电极表面的顶部形成脂质双层。脂质双层的形成可以是自发的。

[0168] 在一些情况下,半导体芯片可以不包含盖,而使用者使用移液管或其它流体转移和/或移动装置(或仪器)将缓冲液体(或溶液),诸如盐水,施加到芯片表面上,以激活脂质分子。一旦脂质分子与缓冲溶液接触,脂质分子即被水合。进入的缓冲液的压力可以促进在每个电极表面的顶部形成脂质双层。

[0169] 在其中半导体芯片包含盖的情况下,在缓冲液体施加于芯片内后,可泵入气泡,并且相较于气泡前面,在气泡后存在更多的缓冲溶液。气泡扫过芯片,使得新水合的预沉积的脂质混合物变光滑并变薄,并且使脂质分子扫过表面。在气泡流过后,在每个电极表面的顶部可以形成脂质双层。

[0170] 在一些情况下,在施加气泡并且气泡扫过芯片后,向电极施加电信号,并且所述电刺激可以导致在电极上形成双层。带有电压电势的电刺激可能会破坏电极表面与电极周围的脂质材料之间的界面,从而导致双层的突然快速形成。

[0171] 在一些实施方案中,所述液态脂质溶液可进一步含有孔蛋白,诸如耻垢分枝杆菌孔蛋白A(MspA)或 α -溶血素。使含有脂质分子和孔蛋白的溶液干燥。芯片的表面用硅烷分子进行制备,以使表面成为疏水性的。脂质分子和孔蛋白以粉末形式或以粘性状态沉积。使用者可通过向芯片施加缓冲溶液而激活芯片。脂质分子和孔蛋白被水合。已插入纳米孔的脂质层可以形成于每个电极表面的顶部。脂质层可自发地形成。

[0172] 在一些情况下,在将缓冲液体施加于芯片内后,泵入气泡。相较于气泡前面,在气泡后可存在更多的缓冲溶液。气泡可扫过芯片,使得新水合的预沉积的脂质和孔混合物变光滑且变薄,并且使脂质和/或孔分子扫过表面。在气泡流过后,可以以上文中或本文中其它处所述的方式在每个电极表面的顶部可以形成脂质双层,并且可将孔蛋白插入双层以形成纳米孔。

[0173] 作为另一选择,或除此以外,在施加气泡并且气泡扫过芯片后,可向电极施加电信号,并且所述电刺激可以导致在电极上形成双层以及纳米孔插入双层中。带有电压电势的电刺激可能会破坏电极的表面并影响电极周围的脂质材料,从而导致双层以及双层中的纳米孔的突然快速形成。

[0174] 在另一个实施方案中,半导体芯片仅被硅烷化,并且不具有任何预先施加的分子如脂质分子或孔蛋白使芯片的表面得以官能化。首先用盐水冲洗芯片表面,即预处理。然后

向芯片上插入有机溶剂诸如,例如癸烷中的脂质等分。随后用气泡来涂抹脂质材料,将所述液体材料分布至芯片表面上并使之变薄。脂质双层通过气泡的接触和分布而在多个电极上方产生。脂质双层可自发地形成。

[0175] 在另一个相关实施方案中,脂质双层在经气泡处理后可能不会自发地产生。向电极施加后续的电刺激和/或其它刺激。据信电刺激和/或其它刺激通过破坏多层和促进单个双层在电极上方形成来产生单个双层。电脉冲导致在电极上形成或破坏双层。

[0176] 在另一个相关实施方案中,将KCL流过芯片并使芯片湿润,即预处理。随后将少量脂质溶液施加于芯片,并使其流过芯片,随后立即施加气泡,所述气泡使脂质变薄并将其分布至芯片上。随后,将盐水流过芯片。此后,将孔蛋白溶液插入到芯片中。随后用另一气泡将孔蛋白混合物涂抹于芯片表面上并使之变薄,从而通过与气泡接触或来自气泡的压力的形式在阵列中的多个独立电极上方插入孔。

[0177] 在又一个相关实施方案中,当插入孔蛋白溶液和第二气泡后,在电极上施加后续的电刺激,以在阵列中的多个电极上方的脂质双层中产生纳米孔。

[0178] 在另一个实施方案中,将有机溶剂诸如,例如,癸烷中的脂质等分插入被离子溶液(诸如盐水)填充或覆盖的芯片中。向电极施加后续的电刺激。电脉冲导致在电极上形成双层。在此实施方案中,没有插入气泡来促进双层的形成。脂质良好地分布于芯片表面上方的电极周围。施加于电极上的电压引起位于电极边缘处的脂质材料的破坏,并诱导脂质双层的形成。

[0179] 半导体纳米孔传感器芯片可以包含一个或多个通道,液体、溶液和试剂可以通过所述通道流动。在一些实施方案中,每个通道具有两条轨道,在通道的每一侧各有一条。电极可以位于通道的底面上。电极还可以位于通道的侧壁表面上(位于轨道上)。可以通过在底部和侧壁表面上创建电极而提高每个通道的电极密度。

[0180] 可以在半导体芯片上使用一个或多个流动池。每一个流动池可用于为芯片上的一个通道插入溶液和气泡。流动池是液体、气泡和试剂可以通过的路径。芯片上充当流动池的整体或部分的通道可以是独立的,使得所述芯片可以独立地同时处理多个不同的样品。

[0181] 在一些实施方案中,在芯片上不存在通道或流动池。向芯片预先施加液态脂质溶液,或液态的脂质-孔混合物溶液。可使所述溶液干燥成粉末形式或粘性状态。将液态缓冲溶液施加于芯片,以激活脂质或脂质-孔混合物。向电极施加电信号,所述电刺激可导致在电极上形成双层。具有电压电势的电刺激可以破坏电极的表面,并影响电极周围的脂质材料,从而导致双层的突然快速形成。此外,如果存在已激活的孔蛋白,则电刺激可进一步促进孔分子向脂质双层内的插入。

[0182] 在一些实施方案中,所述液体或气泡的压力可以变化,以改善双层或纳米孔的形成。在一些实施方案中,芯片和液体的温度可以变化,以改善双层或孔的形成。例如,在形成双层时,可应用比室温稍低的温度;在纳米孔插入脂质双层中时,可应用比室温稍高的温度。

[0183] 芯片可使密封芯片的四个侧边中的一个侧边保持开放并可以进入。其相对的侧边也可以开有一个孔洞,管可以与所述孔洞接触和连接。如果这样放置或以其它方式排列芯片以使其垂直于位于底部的孔洞和管以及位于顶部处的芯片的开口端,则缓冲液体和试剂可以通过顶部添加,于是气泡可以受控的速度从底部释放并向上升流过密封的腔室,并流过

芯片。所述系统可能不具有将滚过芯片的液体组分分隔的气泡列。它使通过封装芯片的开放顶部添加的任何物质变光滑，并在内部向下流过芯片的表面。相反地，可以通过位于所述设备底部的单一管而插入液体和试剂，当可能需要按照自动化的时间顺序添加试剂时，这可能是有利的。

[0184] 在一些情况下，可以将传感器芯片耦接至一种设备，或将传感器芯片置于所述设备内，所述设备可以自动化向传感器芯片或传感器芯片中的液体、试剂或气泡施加液体、试剂、气泡、电刺激脉冲、压力或压力脉冲、温度或温度脉冲、超声脉冲和或声脉冲的任意组合，从而导致双层的自动化生成、孔的生成、双层和孔的维持（包括其再生成）、施加于纳米孔传感器芯片的生物分子的捕获及读取，以及提供关于全部传感器的状态及仪器性能的全部特性的实时和/或终点细节。所述设备可以允许任何水平的操作者人工干预或允许创建自定义测试。所述设备可以响应于先前的测试信号的结果或试剂添加而施加不同的信号和/或试剂，或作用于样品或芯片，从而允许所述设备完全或大体上自动化地运行。此类系统可以允许时间进程实验在无操作者的情况下运行，或允许纳米孔系统的更新，以将传感器芯片的表面重新官能化，从而继续测试。

[0185] 施加刺激以引发双层的产生或孔的产生也可以包括向传感器芯片施加缓冲液（约5.0至约8.5的pH范围）、离子溶液（例如，NaCl、KCl；约75mM至约1M）、气泡、化学物质（例如，己烷、癸烷、十三烷等）、物理运动、电刺激或电刺激脉冲、压力或压力脉冲、温度或温度脉冲、超声脉冲和或声脉冲的任意组合，以刺激所需的或以其它方式预定的双层/孔产生事件。

[0186] 半导体芯片可以不包含盖，而使用者可通过使用移液管或其它仪器手动施加任何和全部缓冲液、试剂及气泡。这些技术的手动施加可以与本文概述的任何施加的刺激相结合，以引发所需的双层和/或孔形成。

[0187] 本公开的流动池或简单气泡系统还能够通过将孔蛋白溶液均匀地施加到传感器芯片表面周围，并且引起自发的孔插入或设置表面以使得缓冲液（约5.0至约8.5的pH范围）、离子溶液（例如，NaCl、KCl；约75mM至约1M）、气泡、化学物质（例如，己烷、癸烷、十三烷等）、物理运动、电刺激或电刺激脉冲、压力或压力脉冲、温度或温度脉冲、超声脉冲和或声脉冲的任意组合对传感器芯片的刺激可促进孔向双层中的快速插入，而极大地有助于孔的插入。流动池或简单气泡系统还可以有助于干燥的脂质-孔-蛋白质混合物的水合，所述混合物可在存在或不存在气泡的情况下在合适的缓冲液中变光滑或混合后，形成自发的双层和孔二者。

[0188] 图23举例说明在预处理的传感器芯片的一个或多个流动通道上的电极上方形成脂质层的示例性方法。所述传感器芯片可以是平面芯片，其包含多个嵌入非导电的或半导体表面和/或基本上与其呈平面的电极，所述表面位于流动通道的表面上。所述方法在第一操作2301中包括：使包含至少一种类型的脂质的脂质溶液流动通过每个流动通道。随后，在第二操作2302中，将脂质沉积在电极表面和/或与电极相邻的区域。在第三操作2303中，在每个流动通道中用后继气泡使沉积的脂质变光滑并变薄。随后，在第四操作2304中，用缓冲溶液再填充每一个流动通道一次。所述缓冲溶液可以是导电的。在第五操作2305中，测量通过电极的电流，以确定是否在每一个电极上方已适当地形成脂质双层。随后在第六任选的操作2306中，如果在任何、所有或大体上所有电极上尚未适当地形成脂质双层，则施加刺激

(例如,电刺激),以诱导表面上的脂质在电极上方形成脂质双层。然而,在某些情况下,不施加电压来产生双层。

[0189] 在一些实施方案中,所述脂质溶液包含至少两种类型的脂质。脂质溶液还可包含至少一种类型的孔蛋白。所述孔蛋白可包含耻垢分枝杆菌孔蛋白A (MspA) 或 α -溶血素。可引导含有孔蛋白的非脂质溶液流过每一个流动通道内沉积的脂质上方。随后可在每个流动通道中使用气泡使孔蛋白和沉积的脂质变薄。随后,可引导孔蛋白溶液、额外的空气(或气体)气泡和额外的液态溶液流动通过流动通道。所述孔蛋白溶液和所述液态溶液可被所述空气气泡所隔开。随后,可通过至少一部分电极施加电刺激,以促进孔蛋白向脂质双层中的插入。使溶液和气泡流动的操作可以任何顺序及组合重复进行,从而实现脂质双层的形成和纳米孔向双层中的插入。在一些实例中,脂质为二植烷酰基磷脂酰胆碱(DPhPC)、棕榈酰基-油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、二油酰基-磷脂酰甲酯(DOPME)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3磷酸胆碱、1,2-二-0-植烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DoPhPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、1,2-二-0-植烷基-sn-甘油;1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-350];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-550];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-750];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-1000];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000];1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-乳糖基;GM1神经节苷脂或鞘磷脂。液态脂质溶液还可含有有机溶剂诸如癸烷。

[0190] 在一些实施方案中,所述缓冲溶液可以含有离子溶液,诸如氯化钠溶液或氯化钾溶液。所述缓冲溶液还可以含有氰化亚铁或抗坏血酸、谷氨酸钠、谷氨酸钾、四甲基氯化铵、四乙基氯化铵、氯化铵等。还可含有海藻糖、蔗糖或任何其它糖。缓冲液还可以含有二价诸如氯化镁、氯化钙、氯化锶、氯化锰等。在一些实施方案中,将气泡和/或流体的压力调节为基本上处于大气压或稍高于或低于大气压,以改善双层的形成或纳米孔的插入。

[0191] 图24举例说明根据本公开的实施方案的示例性半导体传感器芯片。传感器芯片2400包括多个流动通道2410。每一个流动通道具有多个电极2420,所述电极嵌入非导电的或半导体表面并且呈平面或大体上呈平面,所述表面位于流动通道2410的表面上。除电极以外的流动通道的表面为疏水性的。除电极以外的流动通道的表面可以是疏水性的、亲脂性的或其任意组合。可针对不同的特征而处理不同的壁。流动通道2410被沿流动通道的导轨2440隔开。通道宽度可以足够宽,以容纳两行或更多行电极。如图24所示,电极可被制作于流动通道的底面上,以及导轨的侧壁上。在一些实施方案中,将流动通道的顶侧密封。

[0192] 在另一个方面,用于在预处理的传感器芯片(即,已在芯片上方流过缓冲溶液的芯片)的一个或多个流动通道上的电极上方形成脂质双层的方法包括:(a)使包含至少一种类型的脂质的脂质溶液流动通过每个流动通道;(b)将脂质沉积于芯片的表面上;(c)在每个流动通道中用后继或另外的气泡使沉积的脂质变光滑并变薄;(d)进一步将缓冲溶液流动通过每一个流动通道,所述缓冲溶液是导电的;(e)测量通过电极的电流,以确定在每个电极上方是否形成脂质双层;以及(f)如果尚未在任何电极上形成脂质双层,则任选地向至少一个电极施加刺激,以诱导表面上的脂质在电极上方形成脂质双层。所述刺激可包括针对传感器芯片的电脉冲、超声脉冲、压力脉冲和声脉冲中的至少一个,或缓冲液(约5.0至约

8.5的pH范围)、离子溶液(例如,NaCl、KC1;约75mM至约1M)、气泡、化学物质(例如,己烷、癸烷、十三烷等)、物理运动、电刺激或电刺激脉冲、压力或压力脉冲、温度或温度脉冲、超声脉冲和/或声脉冲的任意组合。

[0193] 在一些实施方案中,所述脂质溶液包含至少两种类型的脂质。在一些实施方案中,所述脂质溶液还包含至少一种类型的孔蛋白。

[0194] 在一些实施方案中,在(c)后:引导包含孔蛋白的非脂质溶液流过每个流动通道中沉积的脂质。随后可利用每一个流动通道中的第二气泡使孔蛋白和沉积的脂质变薄。可以以任意顺序或组合重复上述操作至少1次、2次、3次、4次、5次或更多次。

[0195] 在一些情况下,可引导孔蛋白溶液、额外的空气气泡和额外的液态溶液流动通过流动通道。可通过空气气泡分隔孔蛋白溶液与液态溶液。随后,可通过至少一些、全部或大体上全部电极向传感器芯片施加刺激,例如,缓冲液(约5.0至约8.5的pH范围)、离子溶液(例如,NaCl、KC1;约75mM至约1M)、气泡、化学物质(例如,己烷、癸烷、十三烷等)、物理运动、电刺激或电刺激脉冲、压力或压力脉冲、温度或温度脉冲、超声脉冲和或声脉冲的任意组合,以促进孔蛋白在脂质双层中的插入。

[0196] 在一些实施方案中,所述脂质为二植烷酰基磷脂酰胆碱(DPhPC)、棕榈酰基-油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3磷酸胆碱、1,2-二-0-植烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DoPhPC)、二油酰基-磷脂酰甲酯(DOPME)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、1,2-二-0-植烷基-sn-甘油;1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-350];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-550];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-750];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-1000];1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000];1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-乳糖基;GM1神经节苷脂或鞘磷脂。

[0197] 在一些情况下,至少一些液态脂质溶液含有有机溶剂(例如癸烷)。所述孔蛋白,在一些实例中,可包含耻垢分枝杆菌孔蛋白A(MspA)或 α -溶血素。在一些情况下,所述缓冲溶液含有包含一种或多种离子的离子溶液(例如,氯化钠或氯化钾)。在一些实例中,至少一些缓冲溶液含有氰化亚铁或抗坏血酸。在一些情况下,所述缓冲溶液还可含有谷氨酸钠、谷氨酰钾、四甲基氯化铵、四乙基氯化铵、氯化铵、氰化亚铁、氰化铁、醋酸钾等。在一些情况下,所述缓冲溶液还可含有海藻糖、蔗糖或任何其它糖类。在一些情况下,所述缓冲溶液还可含有二价诸如氯化镁、氯化钙、氯化锶、氯化锰等。

[0198] 在一些实施方案中,气泡和/或流体的压力大体上等于或略高于大气压。所述气泡可具有大于大气压的压力,诸如在101kPa至1013kPa的量级的压力下。

[0199] 金属电极的表面是亲水性的。在当电极可以不是金属诸如导电硅的情况下,可在硅烷化过程期间向电极施加电位电压或变化的电位电压,以阻止硅烷粘附于非金属电极和与其反应。可使用 $\pm 10\text{mV}$ 直至 $\pm 2\text{V}$ 的电压和不同浓度的低离子缓冲液与硅烷的混合物。还可能通过循环电极处的电压和沉积后“烧掉”硅烷来从金属或非金属电极除去任何反应的或残留的硅烷。对于非金属电极,在烧掉疏水性硅烷步骤后,可添加亲水性硅烷步骤,并且将仅打开电极上方的空间以与硅烷反应。结果为不是疏水且不是亲脂的而应当是亲水的电

极表面。

[0200] 在一些情况下,除电极以外的流动通道的表面是疏水性的。在一些实施方案中,所述流动通道(除电极以外)的表面可以是疏水性的、亲水性的或其任意组合。可针对不同的特征处理不同的表面(壁或通道底面)。

[0201] 在一些实施方案中,在(a)之前,可通过硅烷化,化学处理除电极以外的流动通道的表面或对所述表面使用或设计特殊材料,来使除电极以外的流动通道的表面为疏水性的;可在芯片的表面上形成多个流动通道;可在每一个流动通道的表面上制造电极;可通过沿流动通道构建导轨来分隔流动通道;可在每一个导轨的侧面制造电极;和/或可使每一个流动通道的顶侧密封。

[0202] 在一些情况下,可通过使离子溶液流过芯片来产生具有双层的芯片。所述流可以是离散的脂质溶液和离子溶液等分(例如,交替的脂质溶液与离子溶液)的“串”。所述流可穿过供应管和横穿芯片。在一些实例中,串可具有至少或约0.1uL、1uL、2uL、3uL、4uL或5uL的液体,和从而至少或约0.1uL、1uL、2uL、3uL、4uL或5uL的离子溶液,并且可被重复1、2、3、4、5、6、7、8、9、10次或更多次。溶液的串可被来回泵送穿过生物芯片的表面约2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多次。随后可电检查覆盖和/或密封。在一些实施方案中,脂质和/或离子溶液的串可为约0.1uL至约1000uL之间。

[0203] 在一些情况下,随后对溶液的串进行装配操作。装配操作可涉及使气泡流动穿过芯片。在一些情况下,可将电气方法用于检查池(包括电极)的覆盖和/或每一个电极处的泄漏或密封电阻。

[0204] 在一些情况下,重复所述装配操作直至获得至少一些或所有以下测试结果:(1)至少约100、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250个或更多个电极被覆盖;(2)在低于-1V的施加电压下弹出至少约100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200个膜(例如,脂质层);(3)在(2)中弹出的脂质层当中,至少40、50、60、70、80、90、100或更多个已在约-300mV至-700mV之间弹出;(4)具有小于约50吉欧姆的密封电阻的电极的数目少于30、20、15或10个;和(5)如果显示任何记录的泄漏电流的池的数目超过50个,则密封电阻的中位数大于150吉欧姆。在一些情况下,重复装配操作直至获得至少一些或全部以下测试结果:(1)至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多,例如,100%的电极被覆盖;(2)至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多,例如,100%的膜(例如,脂质层)在小于±1V的施加电压下被弹出;(3)在(2)中弹出的脂质层中,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多例如100%在约±300mV至±700mV之间弹出;和(4)具有大于10吉欧姆的池的最少数(例如,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%)。

[0205] 如果这些标准的一部分或全部都已满足,则可使具有约10微升(uL)至约1000uL之间的任何尺寸的气泡流过芯片,随后使一定量的缓冲液(例如,约10uL至约10mL)流过芯片,并且可以进行(1)、(4)和(5)的最终测试。如果通过测试,则所述程序移至孔插入方案。所述程序可借助于计算机系统执行(例如,由处理器执行)。

[0206] 在一些情况下,孔插入方案包括向芯片施加至少或约0.1uL、1uL、2uL、3uL、4uL、5uL或高达约1mL的孔蛋白溶液,并施加刺激,例如电穿孔以向双层中插入孔。在电穿孔操作结束时,可检查芯片的孔产率,如果通过该标准,则施加样品和测试试剂。

[0207] 双层产生和孔插入的总时间可以是任何合适的值。在一些情况下，总时间为约1分钟、约5分钟、约10分钟、约20分钟、约30分钟、约45分钟、约1小时或约2小时。在一些情况下，总时间少于约1分钟、少于约5分钟、少于约10分钟、少于约20分钟、少于约30分钟、少于约45分钟、少于约1小时或、或少于约2小时。在一些情况下，约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%的总时间用于双层形成。可在双层形成和孔插入之间分割总时间的任何比例。在一些情况下，形成双层，并同时插入纳米孔。在一些情况下，双层和孔插入的总时间平均为，15分钟的双层生成和20分钟的孔插入，总共35分钟。

[0208] 任何数量的小孔可被具有插入的孔(例如，孔产率)的膜(例如，脂质双层)覆盖。在一些情况下，所述孔产率为约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%等。在一些情况下，所述孔产率为至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%等。

[0209] 在一些实施方案中，施加于电极芯片和试验装置的参数为1M KC1或300mM NaCl，pH 7.5(在约5.0至约8.5的pH范围)、当前流体流动速率(例如，约1uL/秒至约1000uL/秒之间)、海平面大气压和室温。

[0210] 使用凝胶支持膜

[0211] 在一个方面，用于形成生物芯片或传感器的方法包括用适合于膜(例如，包含纳米孔的脂质双层)的粘附的层涂覆衬底。所述衬底可用有机官能烷氧基硅烷分子进行硅烷化。图18显示了其中可将膜配置于硅烷化表面上的生物芯片。

[0212] 在一些情况下，膜难以形成和/或不稳定，这至少部分归因于膜在硅烷化的二氧化硅上被支持，但在小孔上方不被支持。应当认识到并且在本文中描述了用凝胶填充小孔可以支持在小孔区域上方的膜，从而使得更容易形成膜和/或使该膜稳定。在一些实施方案中，小孔的空部中填充有凝胶，如图19中显示的。所述凝胶可为配置于小孔上方的膜提供机械支持。

[0213] 在其它实施方案中，可通过使用包含海藻糖或其它糖类的缓冲液来使膜化学稳定。

[0214] 在一个方面，用于制备生物芯片的方法包括：(a) 将凝胶沉积至与电极和感测电路接近的小孔中；和 (b) 在小孔上方形成膜，其中所述膜至少部分地被凝胶支持。

[0215] 在各种实施方案中，凝胶是非反应性的，交联的，包含液体电解质，或其任意组合。凝胶可包括但不限于标准试剂凝胶诸如琼脂糖和市售专有凝胶基质。实例是胶原蛋白、层粘连蛋白、水凝胶、Q凝胶(QGel) 和HydroMax凝胶。

[0216] 纳米孔的插入

[0217] 在一些情况下，将纳米孔插入膜中(例如，通过电穿孔)。可通过刺激信号诸如电刺激、压力刺激、流体流动刺激、气体气泡刺激、超声、声、振动或其任意组合来插入纳米孔。所述纳米孔可以是蛋白质纳米孔诸如 α -溶血素或耻垢分枝杆菌(MspA) 纳米孔或与 α -溶血素或MspA的任一个具有至少约70%同源性的纳米孔。

[0218] 在一些实施方案中，插入纳米孔包括通过所述电极施加刺激(例如，电穿孔脉冲)以促进所述纳米孔的插入。在一些情况下，在这之后进行第二电检测脉冲来检测所述纳米孔在所述脂质双层中的插入。可快速和/或多次地并以顺序变化的用于电穿孔脉冲的电压水平重复利用电穿孔脉冲和随后检测脉冲，直至孔被插入和实现检测。在一个实施方案中，

初始电穿孔脉冲为约50mV(正的或负的),重复1至10次,每一个后续批次的电穿孔脉冲以约1mV从先前的电穿孔脉冲递增至约±700mV的最大值,即,阶梯递增电压。在每一个电穿孔脉冲之间的检测脉冲为+160mV。因此,例如,将纳米孔插入脂质双层的过程将是50mV电穿孔脉冲的施加和检测脉冲的施加(5次),51mV电穿孔脉冲的施加和检测脉冲的施加(5次)等。重复该过程,直至纳米孔被插入,在该情况下,关闭电极,或直到电极/小孔被拒绝或被判定为已失败。

[0219] 在一些情况下,酶,例如聚合酶(例如,DNA聚合酶)或其它酶(例如,逆转录酶),被连接至纳米孔和/或位于纳米孔附近。可在将纳米孔掺入膜之前或之后,将聚合酶/酶附着于纳米孔。在一些情况下,所述纳米孔和聚合酶/酶为融合蛋白(即,单条多肽链)。应理解的是,虽然贯穿始终以聚合酶为例,但可使用任何合适的酶。

[0220] 可以以任何合适的方式将聚合酶附着于纳米孔。在一些情况下,将聚合酶附着于溶血素蛋白单体,然后装配完整的纳米孔七聚体(例如,以一个具有附着的聚合酶的单体对6个无附着的聚合酶的溶血素单体的比率)。随后将纳米孔七聚体插入至膜中。

[0221] 用于将聚合酶附着于纳米孔的另一种方法涉及将接头分子附着于溶血素单体或使溶血素单体突变以具附着位点,随后装配完整的纳米孔七聚体(例如,例如,以一个具有接头和/或附着位点的单体对6个无接头和/或附着位点的溶血素单体的比率)。应当理解,可利用具有接头和/或附着位点的单体(H^+)与无接头和/或附着位点的溶血素单体(H^-)的组合来实现具有任何比率的亚单位的七聚体溶血素纳米孔,例如, $(H^+)_2(H^-)_5$ 、 $(H^+)_3(H^-)_4$ 、 $(H^+)_4(H^-)_3$ 等。随后可将聚合酶附着于附着位点或附着接头(例如,在插入膜之前,以散装形式存在)。还可在于膜中形成(例如,七聚体)纳米孔之后,将聚合酶附着于附着位点或附着接头。在一些情况下,将多个纳米孔-聚合酶对插入生物芯片的多个膜(例如,配置在小孔和/或电极上方的)。在一些情况下,在各电极上方的生物芯片上发生聚合酶至纳米孔复合物的附着。

[0222] 可以以任何合适的化学方法(例如,共价键和/或接头)将聚合酶附着于纳米孔。在一些情况下,利用分子钉(molecular staple)将聚合酶附着于纳米孔。在一些情况下,分子钉包含三个氨基酸序列(指示的接头A、B和C)。接头A可从溶血素单体延伸,接头B可从聚合酶延伸,以及接头C可结合接头A和B(例如,通过环绕接头A和B)并从而将聚合酶附着于纳米孔。接头C也可被构建为接头A或接头B的部分,从而减少接头分子的数目。接头也可以是生物素和链霉抗生物素蛋白。

[0223] 在一些情况下,使用SolulinkTM化学将聚合酶连接于纳米孔。SolulinkTM可以是HyNic(6-肼基-烟酸,一种芳香肼)与4FB(4-甲酰基苯甲酸酯,一种芳香醛)之间的反应。在一些情况下,使用点击化学(Click chemistry)(例如可从LifeTechnologies获得的)将所述聚合酶连接于纳米孔。在一些情况下,将锌指突变引入溶血素分子,随后使用分子(例如,DNA中间体分子)将聚合酶连接于溶血素上的锌指位点。

[0224] 用于检测双层形成的方法

[0225] 在试图于上述传感器上产生双层后,可施加电刺激以确定双层是否已被建立或电极是否被非双层的层简单地覆盖。进行该过程的一个方法是向层覆盖的电极施加非破坏性AC刺激,和寻找指示电极被薄的电容性脂质双层(或其它薄层)覆盖的电容电流应答。

[0226] 如果检测到盐、电压和电极直径条件的合适的电容读数,则可推断出双层已在电

极上方产生，并且操作者准备开始孔插入步骤。

[0227] 或者，可对阵列的每一个电极施加按顺序递增的电压脉冲的破坏性应用，并且记录电极上方的层破裂时的电压。如果看到的横跨可接受的数目的电极的电压对应于对于盐、电压和电极直径条件所预期的双层破裂电压，则使单个气泡流过芯片，重建双层，并且操作者准备开始孔插入步骤。

[0228] 用于形成小孔和纳米孔装置的系统

[0229] 本公开的另一方面提供用于形成纳米孔装置（包括小孔）的系统。此类系统可用于形成与小孔或电极相邻的膜（例如，脂质双层），并将纳米孔插入膜中。

[0230] 所述系统可包括沉积系统、与沉积系统流体连通的泵送系统和具有用于执行机器可读代码（执行用于形成小孔的方法）的计算机处理器（在本文中也称为“处理器”）的计算机系统（或控制器）。所述代码可执行本文中提供的任何方法。泵送系统可被配置来清除或排除沉积系统。在一些情况下，所述沉积系统被排除。

[0231] 所述沉积系统可包括一个或多个反应空间以形成小孔的材料层。在某些情况下，所述沉积系统是具有一个或多个互连的反应室的卷对卷式（roll-to-roll）沉积系统，其可彼此流体隔离（例如，在小室之间的位置处借助于吹扫或抽吸）。

[0232] 可将一个或多个沉积系统用于形成小孔。沉积系统可被配置用于各种类型的沉积技术，诸如，例如，化学气相沉积（CVD）、原子层沉积（ALD）、等离子体增强CVD（PECVD）、等离子体增强ALD（PEALD）、金属有机CVD（MOCVD）、热丝CVD（HWCVD）、初始化CVD（iCVD）、改进的CVD（MCVD）、气相轴沉积（VAD），外部气相沉积（OVD）和物理气相沉积（例如，溅射沉积、蒸发沉积）。沉积系统可被配置来使得使用各种半导体制造技术诸如光刻来进行逐层形成。

[0233] 泵送系统可包括一个或多个真空泵，诸如一个或多个涡轮分子的（“涡轮”）泵、扩散泵、离子泵、低温（“低温”）泵和机械泵。泵可包括一个或多个前级泵。例如，涡轮泵的备用泵可以是机械泵。

[0234] 在一些情况下，借助于沉积系统在衬底上形成包含一个或多个小孔的阵列。可借助控制器调节沉积。在一些实施方案中，控制器被配置来调节一个或多个工艺参数，诸如衬底温度、前体流动速率、生长速率、载气流速和沉积室压力。所述控制器包括被配置来帮助执行机器可执行代码的处理器，所述代码被配置执行本文中提供的方法。将所述机器可执行代码存储在物理存储介质诸如闪存、硬盘或被配置来存储计算机可执行代码的其它物理存储介质上。

[0235] 可将控制器耦接至该系统的各种组件。例如，控制器可与所述一个或多个沉积系统和/或流体流动系统（例如，泵送系统）通信。所述控制器可与所述泵送系统通信，这可使控制器能够调节外壳的压力。

[0236] 控制器可被编程或以其它方式配置来调节一个或多个工艺参数，诸如衬底温度、前体流动速率、生长速率、载气流速、前体流动速率和沉积室压力。所述控制器，在一些情况下，与沉积室的阀门或多个阀门通信，所述阀门帮助终止（或调节）前体在沉积室中的流动。所述控制器包括被配置来帮助执行被配置来执行本文中提供的方法的机器可执行代码的处理器。所述机器可执行代码被存储在物理存储介质诸如闪存、硬盘或被配置来存储计算机可执行代码的其它物理存储介质上。所述控制器也可被用于调节膜和/或孔的形成，诸如脂质溶液至流体流路中的流动，一个或多个气泡在流体流路中的流动，以及一个或多个刺

激(例如,电刺激)的施加。

[0237] 本文中提供的系统和方法的方面可体现在编程中。技术的各个方面可被认为是通常以机器(或处理器)可执行代码的形式存在的“产品”或“制品”和/或在一种类型的机器可读介质上运行或体现的相关数据。机器可执行代码可被存储在电子存储单元上,诸如存储器(例如,只读存储器、随机存取存储器、闪速存储器)或硬盘。“存储”型介质可包括计算机、处理器等的任何或所有的有形存储器或其关联模块,诸如各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等,其可在任何时间为软件编程提供非暂时性存储。整个软件或其各部分可不时地通过因特网或各种其它电信网络来通信。例如,此类通信可实现软件从一个计算机或处理器向另一计算机或处理器中(例如,从管理服务器或主机向应用服务器的计算机平台中的)的加载。因此,可承载软件元件的另一类型的介质包括经由有线和光学陆线网络以及通过各种空中链路的光波、电波和电磁波,诸如跨本地设备之间的物理接口使用的光波、电波和电磁波。携载此类波的物理元件,诸如有线或无线链路、光学链路等,也可被认为是承载软件的介质。如本文所使用,除非局限于非暂时性的有形“存储”介质,否则诸如计算机或机器“可读介质”等术语是指任何参与向处理器提供用于执行的指令的介质。

[0238] 因此,机器可读介质,诸如计算机可执行代码,可以采取许多形式,包括但不限于:有形存储介质、载波介质或物理传输介质。非易失性存储介质包括,例如光盘或磁盘,诸如任何一个或多个计算机中的任何存储设备等,诸如可用于实现附图中所示的数据库等。易失性存储介质包括动态存储器,诸如此类计算机平台的主存储器。有形传输介质包括同轴电缆;铜线和光纤,包括计算机系统内的总线的线缆。载波传输介质可采用电信号或电磁信号或者声波或光波的形式,诸如在射频(RF)和红外线(IR)数据通讯过程中生成的电信号或电磁信号或者声波或光波。计算机可读介质的常见形式因此包括,例如:软盘、柔性盘、硬盘、磁带、任何其它磁介质、CD-ROM、DVD或DVD-ROM、任何其它光学介质、穿孔卡片纸带、任何其它具有孔洞图案的物理存储介质、RAM、ROM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其它存储器芯片或磁片盒、传送数据或指令的载波、传送此类载波的电缆或链路,或者计算机可从中读取编程代码和/或数据的任何其它介质。这些计算机可读介质形式中的许多形式可涉及向处理器传送一个或多个指令的一个或多个序列以供执行。

[0239] 用于形成脂质双层,在脂质双层插入纳米孔,和对核酸分子进行测序的方法可见于PCT专利公布第W02011/097028号(其通过引用整体并入本文)。在一些情况下,借助气泡形成膜,并借助电刺激将纳米孔插入所述膜中。

[0240] 本文中描述的是生物芯片和/或通过本文所述的方法产生的生物芯片的用途。所述生物芯片可用于测定甲基化核酸碱基在核酸碱基的序列中的存在。

[0241] 本文所述的生物芯片可用于测定药物或任何人造的或天然存在的分子对跨膜蛋白或膜结合蛋白的稳定性或性能的作用。检测器可以通过创建单独可寻址的电极的阵列(例如,大于2)来建立,可如本文中所述在所述电极阵列上产生人工或天然细胞膜或任何绝缘层。可使用本文所述的方法向这些膜、层或绝缘层中插入任何数量的预选或未知的跨膜蛋白质。可将任何跨膜蛋白插入脂质双层(或任何绝缘层),并例如通过检测施用特定药物后膜的破坏来电感测和检测化学物质、药物和任何生物或人造分子对这些跨膜蛋白的稳定性或性能的作用。其存在可被离子或电检测的任何跨膜蛋白在上述测定中提供甚至更多的信息,因为所述分子响应电刺激的变化可与特定药物的施加或施加在双层/孔上的环境的

变化相关联。

[0242] 本文描述的生物芯片可以用于测定药物或任何人造或天然分子对置于阵列传感器的不同部分上方的不同膜的稳定性或性能的作用。通过使用在本申请中的附图中确定的通道，可将不同的脂质双层材料或绝缘层引导至阵列芯片的不同区域，以及可将多个不同的脂质膜或绝缘层呈递给测试溶液，每一个膜/层类型存在于已知的位置处。可检测药物影响膜/层类型或任何人造或天然存在的分子影响不同膜的能力。

[0243] 本文所述的生物芯片可用于检测特定蛋白质或特定生物分子在未知溶液中的存在、捕获、分选和框并所述蛋白质或生物分子。

[0244] 生物芯片以及制造和使用本文所述的生物芯片的方法可使用电解质溶液。在一些情况下，电解质溶液中的离子流过纳米孔并且被电极检测到。在其中电极是牺牲电极（即，在检测过程中被耗尽的，例如银）的情况下，当电解质包含，除其它以外，一些盐时，所述电极可持续相对较长时间。在一些实施方案中，所述电解质不包含钾离子（例如，因为钾离子导致相对较短的电极寿命）。在一些实施方案中，所述电解质包含氯化锂、四甲基氯化铵、三乙基氯化铵、氯化铵、氯化钠、谷氨酸钾、谷氨酸钠或其任意组合（例如，因为所列的盐导致相对较短的电极寿命）。

[0245] 本公开的生物芯片可借助于电阻性、感应性或电容性感测进行感测测量。在一些情况下，生物芯片包含可感测与电极相邻的膜在所述膜或膜中的纳米孔与和膜或纳米孔相邻或接近的种类相互作用后的电容的电极。此类测量可借助于施加的交流电（AC）波形或直流电（DC）波形来进行。

实施例

[0246] 以下实施例是本公开的各种实施方案的举例说明并且是非限制性的。

实施例1. 形成双层和插入孔

[0248] 使用手动注射器装置和自动化注射器泵装置在流动池上形成双层和插入孔导致高的双层和单溶血素孔产率。通过将1M或0.3MKCl溶液和空气气泡流过脂质覆盖的芯片表面和施加电刺激在两个装置上形成双层。两个溶血素施加方法导致高的单孔产率。一个方法包括下列操作：(1)使溶血素与癸烷中的脂质预混合，(2)使溶血素-脂质混合物流过芯片表面，并孵育数分钟，(3)形成双层，和(4)施加电刺激以将孔电穿孔至双层中。第二方法包括下列操作：(1)使KCl流过芯片表面，(2)使癸烷中的脂质流过芯片表面，(3)形成双层，(4)使溶血素流过芯片表面，或使溶血素和反应混合物流过芯片表面，(5)施加电刺激以将孔电穿孔至双层中，和(6)使KCl流过芯片表面以除去游离溶血素。可在所述方法之后在芯片上进行试剂混合，或仅使溶血素与试剂在芯片上混合，随后开始读数。在两种施加方法的电穿孔操作过程中，可加热芯片至使双层更具流体性以使溶血素更容易插入。在电穿孔操作过程中或之后将温度降至室温或更低，以增加孔的寿命。

实施例2. 流动池的构型

[0250] 参考图25和图26，通过将垫圈直接置于半导体芯片的顶部来在芯片封装上装配流动池。垫圈厚度在50μm至500μm的范围内变化。垫圈可由在一侧或两侧上具有压敏粘合剂的塑料、硅酮膜或柔性弹性体诸如EPDM组成。垫圈可被做成任何形状。硬质塑料顶部（例如，由PMMA制成）被置于垫圈的顶部（例如，由PSA层叠的PMMA制造的），并且可通过压敏粘合剂或

对垫圈施加压缩力的锁定机构被密封至该垫圈。所述顶部具有用于将试剂和空气流过流动池的单个或多个入口和出口端口。

[0251] 在一些情况下，整体垫圈尺寸为4x4平方毫米。在一些情况下，对于500um厚的垫圈构型，流通池体积为约1.5ul。在一些实施方案中，约15至20个电极被覆盖在垫圈下。

[0252] 实施例3.形成双层的方案

[0253] 1.通过使300mM KC1流过芯片/流过通道来湿润芯片表面。

[0254] 2.流过20uL 7.5mg/ml的癸烷中的DPhPC，随后流过120uL 300mM KC1、20mM HEPES, pH 7.5 (“KC1”）。

[0255] 3.施加范围从±250mV至±1V(以30pA去活化)的一系列负电脉冲。

[0256] 4.利用2x (20uL KC1,20uL气泡)，随后利用120uL KC1洗涤芯片。

[0257] 5.重复步骤3。

[0258] 6.重复操作4和5直至至少30%的细胞在300mV至700mV脉冲的量级之间去活化(例如,约4至8次)。

[0259] 7.利用2x (20uL KC1,20uL气泡) 和120uL KC1将细胞复原。

[0260] 步骤6是测试单个脂质双层对比多层、多叠层或非双层构型的破坏性试验。利用单个双层构型实现最佳性能。

[0261] 上文中在步骤4和6中使用的气泡在约2uL至约300uL的范围内。流动速率(液体和气泡的)在约1uL/秒至约250uL/秒的范围内,优选流动速率为约10uL/秒。

[0262] 手动进行该方案。自动化方法描述于下文中的实施例6中。

[0263] 实施例4.孔插入方案

[0264] 方法1:实验开始时将溶血素与脂质混合

[0265] 1.在形成双层后,在流动池的顶部设置手持加热器(set hand warmer)。

[0266] 2.利用在-50mV至-600V(以10pA去活化)范围内变化的一系列负电脉冲将孔电穿孔至双层中。

[0267] 随后用300mM KC1洗涤板以除去过量溶血素。

[0268] 方法2:将溶血素流过双层,随后进行先清洗(wash-first)电穿孔:

[0269] 1.在形成双层后,将20uL 100ug/ml在0.3M KC1(于20mM HEPES, pH 7.5 (“KC1”）和5%甘油中)中的溶血素流过流动池。

[0270] 2.利用20uL气泡和80uL 0.3M KC1,pH 7.5进行洗涤。利用300mM KC1,pH 7.5洗掉过量溶血素。

[0271] 3.利用比室温暖和的温度设置将孔电穿孔至双层中。

[0272] 方法3:利用溶血素电穿孔进行双层形成

[0273] 1.除无洗涤步骤(步骤2)外与方法2相同。

[0274] 实施例5.利用泵自动化的双层形成和弹出

[0275] 图27显示在重复的双层产生和洗涤条件下的双层弹出时的电压对比池位置。自动化气泡和KC1洗涤方案允许一致的双层形成。表1显示在各种条件(例如,利用溶血素和脂质或不利用溶血素)下的双层形成和弹出率。

[0276] 表1.双层形成和弹出

芯片 ID	覆盖%	弹出%
120830_CC 01-1	99%	76%
120824_CC 06-1	94%	59%
[0277]	120801_CC 01-1	92%
	120803_MT 01-1	73%
	120802_CC - 01-1	87%
	120731_MT 01-1	100%
		89%
	120803_MT 01-1	73%
[0278]		51%

[0279] 覆盖% = 开始时被脂质(不一定是双层)覆盖的池的数目。

[0280] 弹出% = 缩短所述池被弹出的持续时间的电极的数目。

[0281] 实施例6:完全自动化的双层形成

[0282] 本实施例提供了用于芯片的自动双层产生方案的概述。本方案可被分成两个部分:启动、验证和制备用于双层形成的芯片,以及使芯片上的实际双层形成变薄。

[0283] 启动

[0284] 启动方案具有3个主要步骤:干检查、短检查和任选的条件化。干检查由向每一个电极施加电压以验证没有给出异常数据读数组成。这通常通过施加电压脉冲和计数读取电流的池来完成。如有实际上给电流信号,则该电极被认为是坏的。如果太多的池是坏的,则该过程结束。下一步骤是短检查。使所需的盐/缓冲溶液在芯片上流过,并向每一个电极施加电压以确认全部给予短路读数。这通常通过施加电压脉冲和计数给予在轨读数的池来完成。如果没有足够的池是好的(即,给予在轨读数),则该过程结束。启动方案中的最后步骤是任选的条件化。该步骤用于法拉第电极,和训练所述电极以使它们进入对于电化学是理想的状态。这通常通过向所述池施加一系列电压脉冲和/或斜坡来实现。

[0285] 变薄

[0286] 变薄方案具有4个主要步骤:脂质添加、泄漏测试、双层弹出和双层恢复。启动方案完成后,将芯片覆盖于所需盐溶液中,并且电极处于良好状态以用于实验的其余部分。第一步是将脂质添加至系统中。将小体积的脂质/有机溶剂混合物在芯片上流过,随后流过更多的盐溶液。我们随后进入事件的循环,当变薄方案已认定该芯片具有足够的覆盖范围和双层弹出时退出。循环的第一部分是泄漏测试。该测试施加阶梯递增电压,并测试池的两件事:其是否被脂质材料覆盖以及如果是,则该覆盖的密封电阻是什么。如果没有足够的池被覆盖和具有高的密封电阻,则将较大体积的空气气泡流过芯片。已显示这增加我们在芯片上的覆盖。另一个泄漏测试紧跟该空气气泡。将重复该循环,直至足够的覆盖和密封电阻被测量或太多的测试连续失败,从而使过程结束。通常地,其会在第一次后通过,并且该过程将移至双层弹出代码。所述双层弹出代码施加递增电压的矩形波,一直至±1V。这是将弹出双层,但覆盖池而无双层不弹出的破坏性试验。通常地,在第一轮未观察到足够的弹出,因此气泡流过芯片。不被理论所束缚,据信该气泡重新分配脂质材料,在弹出的池上方重新形

成双层，并且还在未弹出的池上方使脂质材料变薄。在数轮泄漏测试后，双层弹出且气泡、弹出的池的阈值将被命中，这表明双层已在大多数池的上方形成。在芯片被认为完成后，所述芯片准备用于纳米孔的插入。

[0287] 计算机实现

[0288] 上面的方案可被自动化和/或在计算机系统上实现。用于在生物芯片上产生脂质双层的计算机实现的方法包括：

[0289] 用于从多个储液池选择流体和用于将每一份流体分配至包含多个池的生物芯片的流体分配装置，其中按预先选择的顺序分配每一份流体；

[0290] 多个储液池，每一个储液池含有从缓冲液、脂质液体、洗涤流体选择的流体，

[0291] 气泡产生装置，其中在预定的时间提供气泡；

[0292] 用于从生物芯片的多个小孔除去流体的抽吸器或重力给料去除系统；

[0293] 包含多个电极的生物芯片，所述电极被配置来用于检测和/或测定聚合物序列；和

[0294] 用于控制流体和气泡循环的进程，以在生物芯片上形成脂质双层的控制系统。

[0295] 所述气泡产生系统可以是对空气的开口，以使得通过从暴露于空气的阀孔拉入空气，或通过从附接于空气供应装置的阀孔拉入空气，并将其推动通过所述系统来产生气泡。

[0296] 虽然在本文中已显示和描述了本发明的优选的实施方案，但对于本领域技术人员来说显而易见的是，此类实施方案仅通过举例的方式提供。许多变型、变化和取代现将在不背离本发明的情况下对本领域技术人员发生。应当理解的是，可将本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案用于实践本发明。下列权利要求旨在确定本发明的范围，并且这些权利要求范围内的方法和结构及其等效物由此被涵盖。

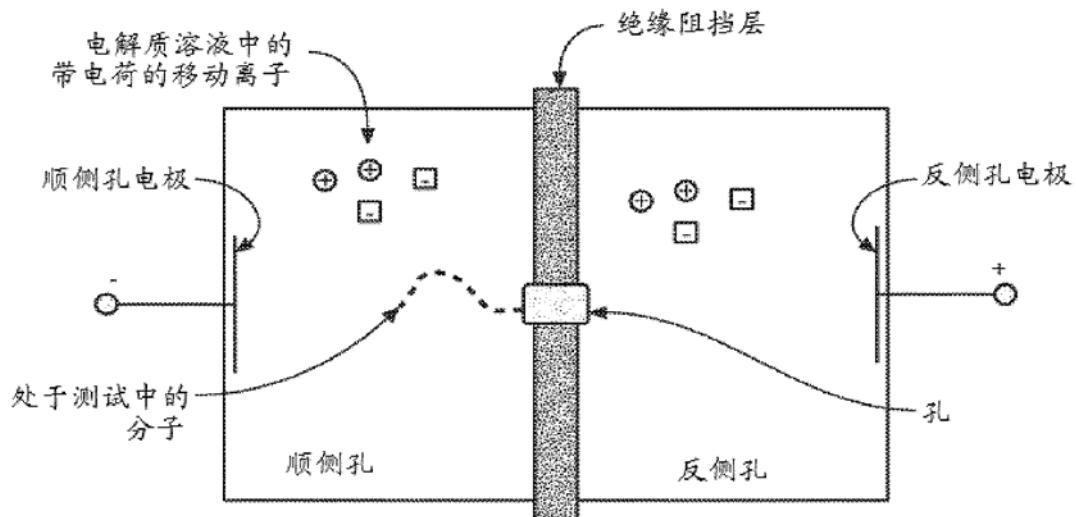


图 1

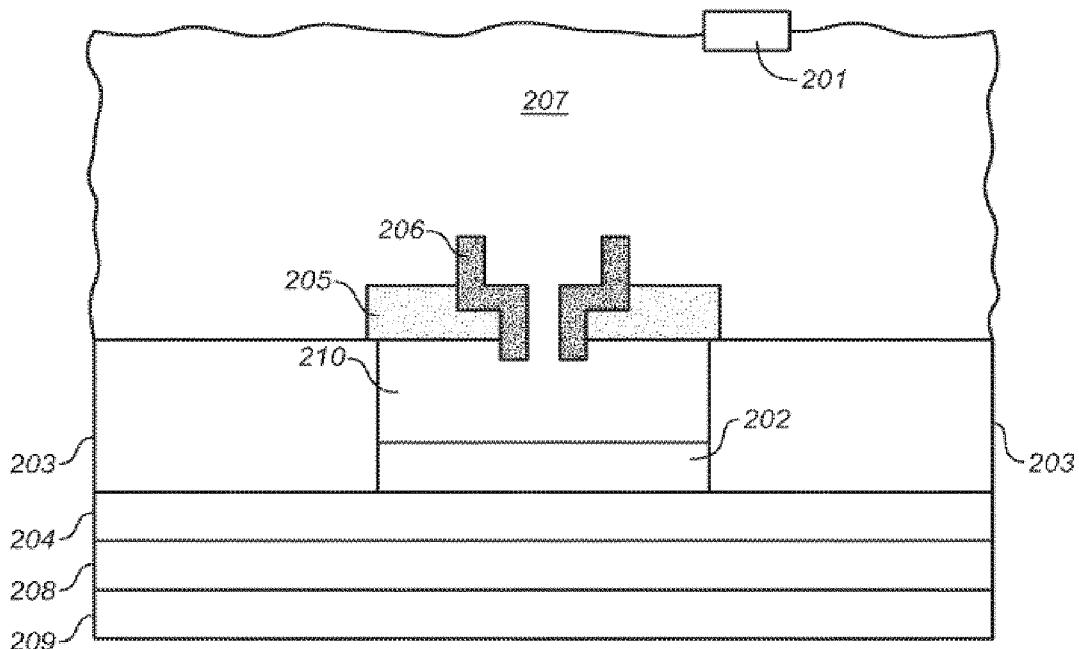


图 2

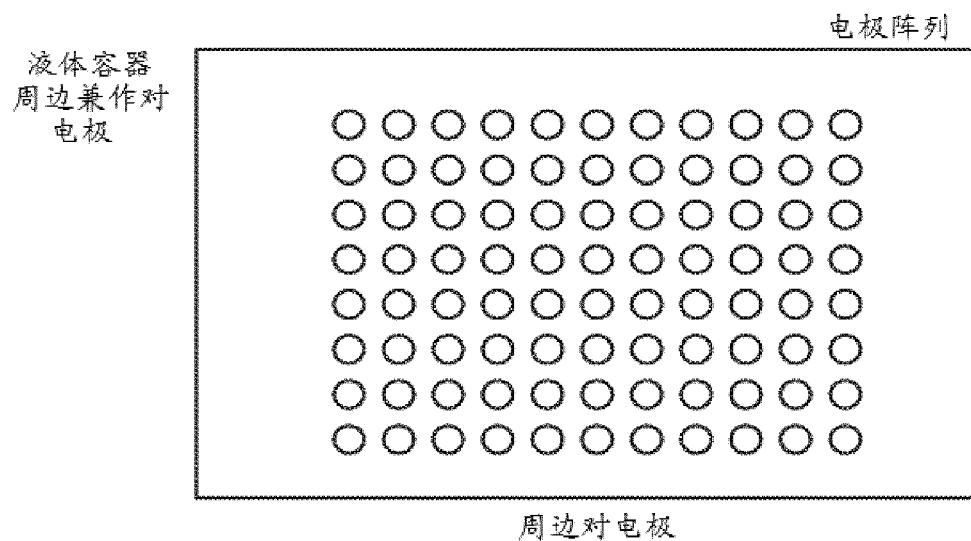


图 3

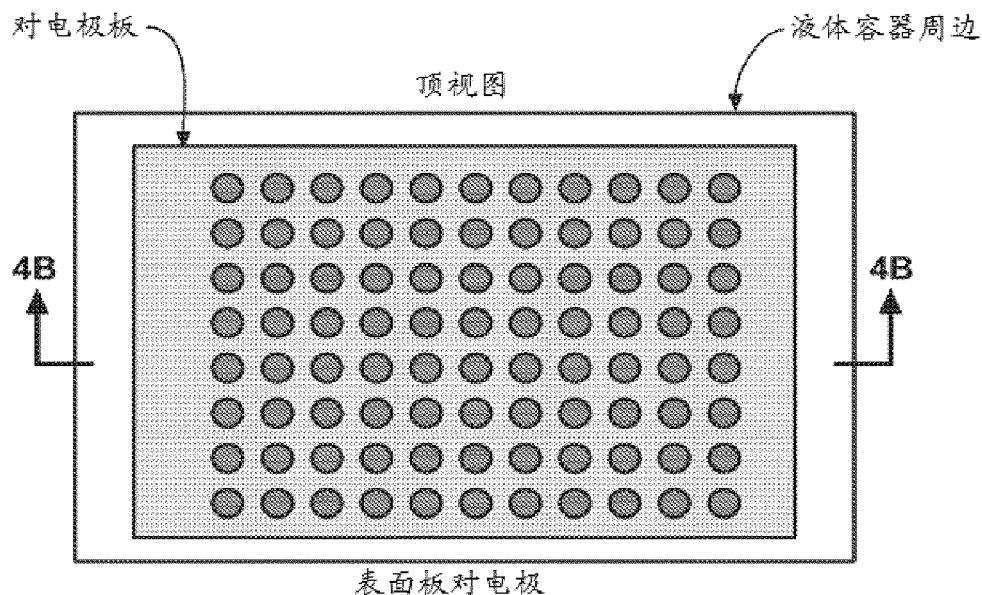


图 4A

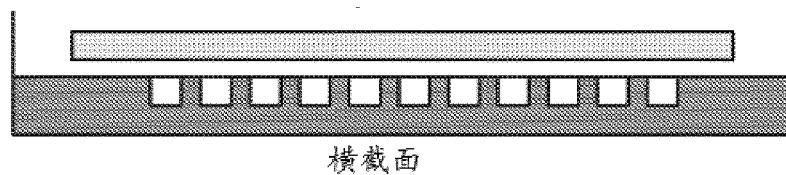
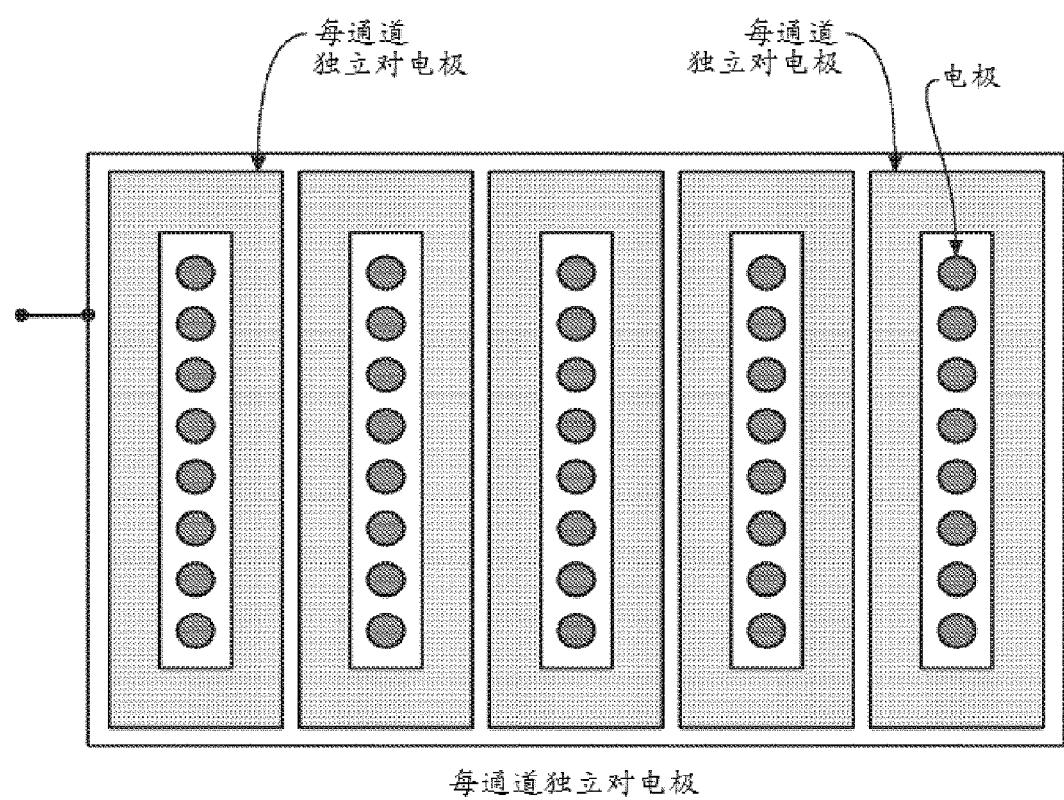


图 4B



每通道独立对电极

图 5

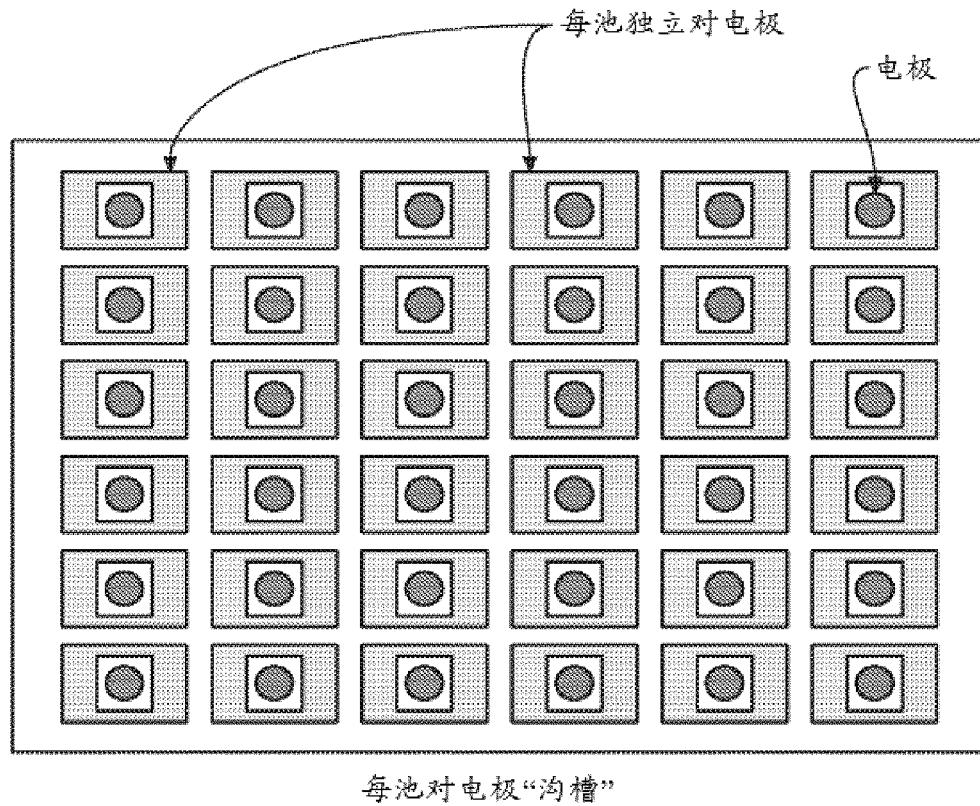


图 6

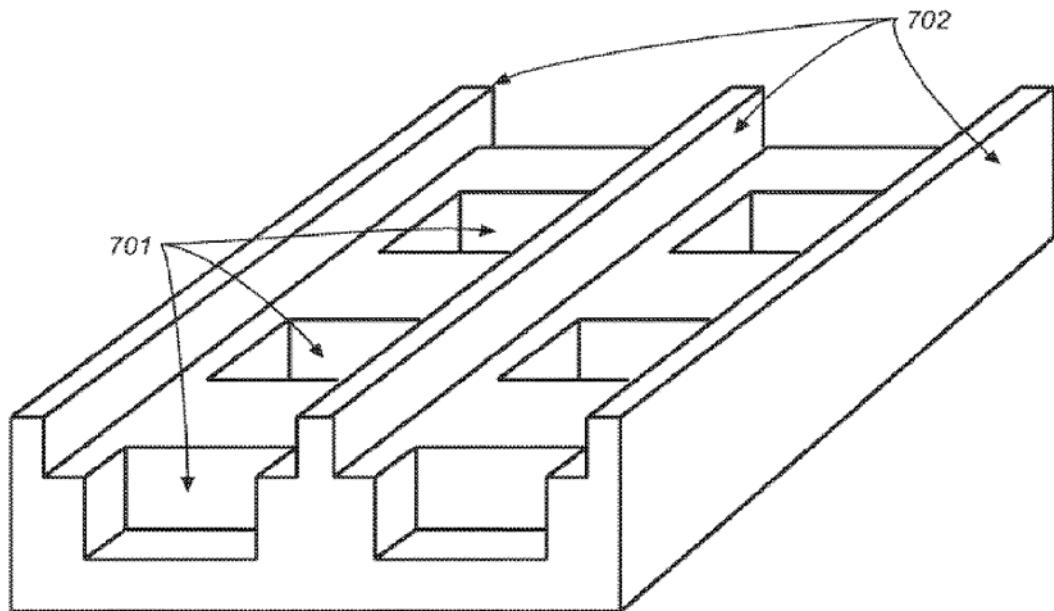


图 7

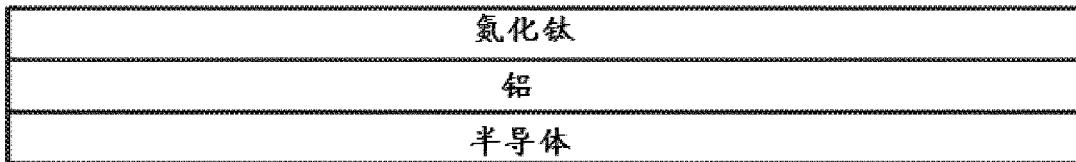


图 8

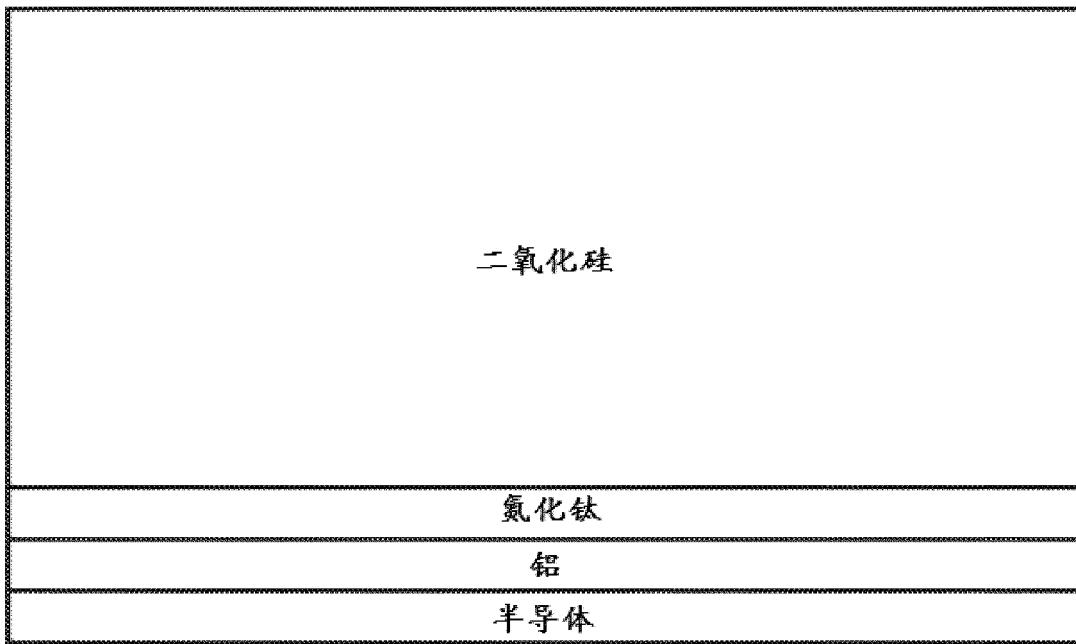


图 9

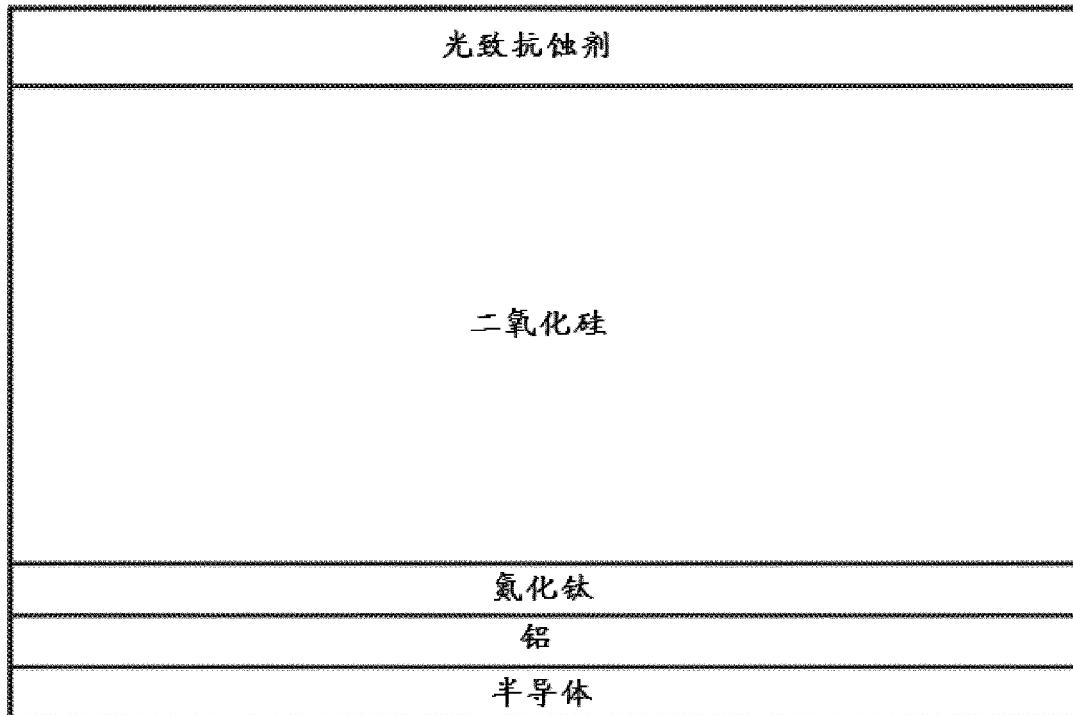


图 10

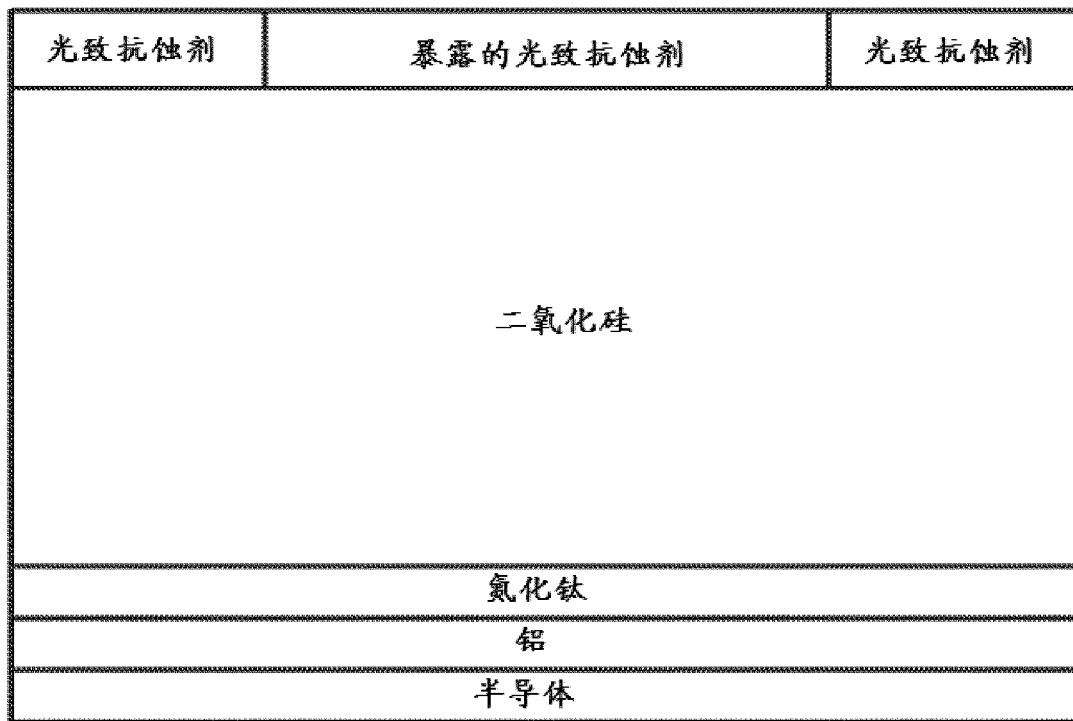


图 11

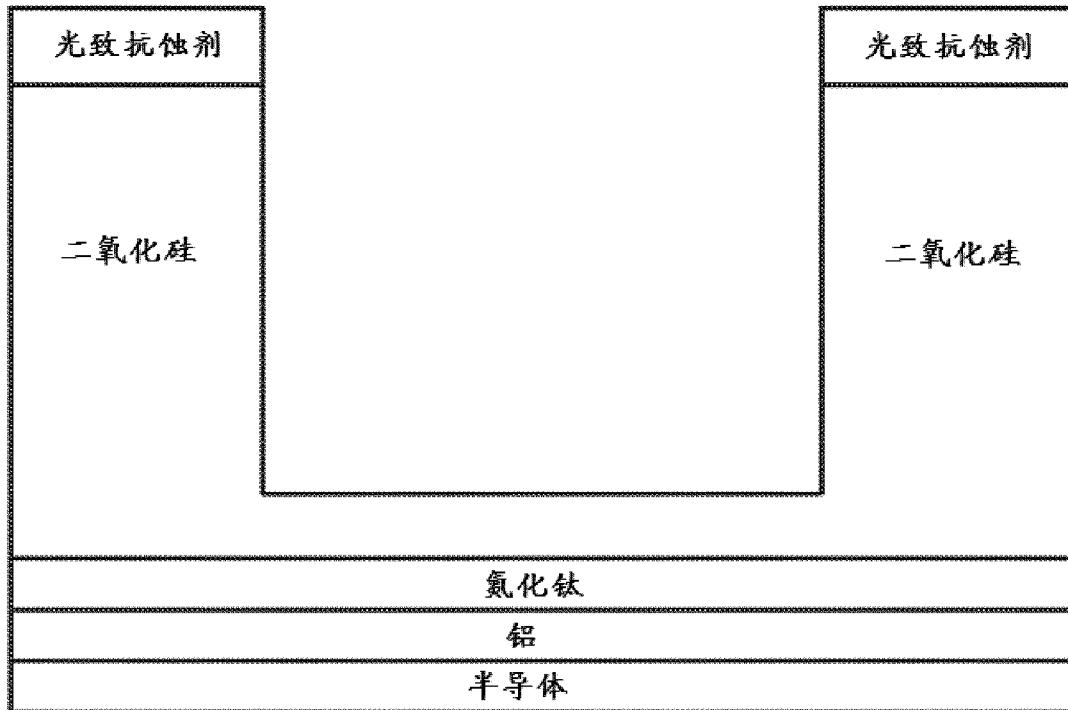


图 12

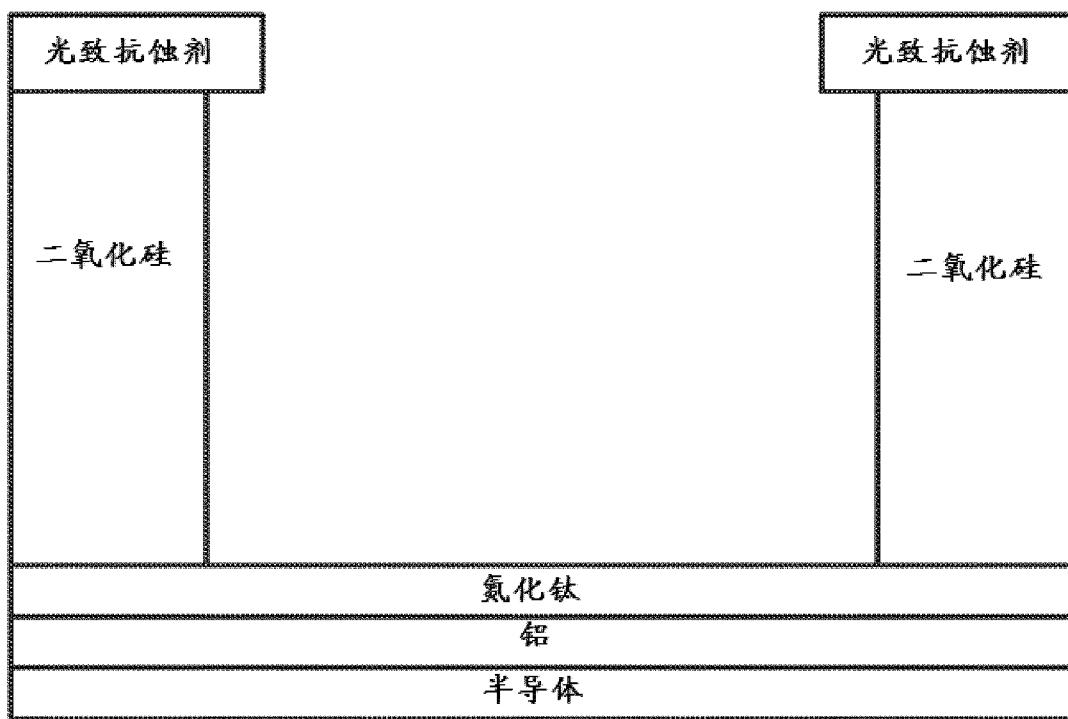


图 13

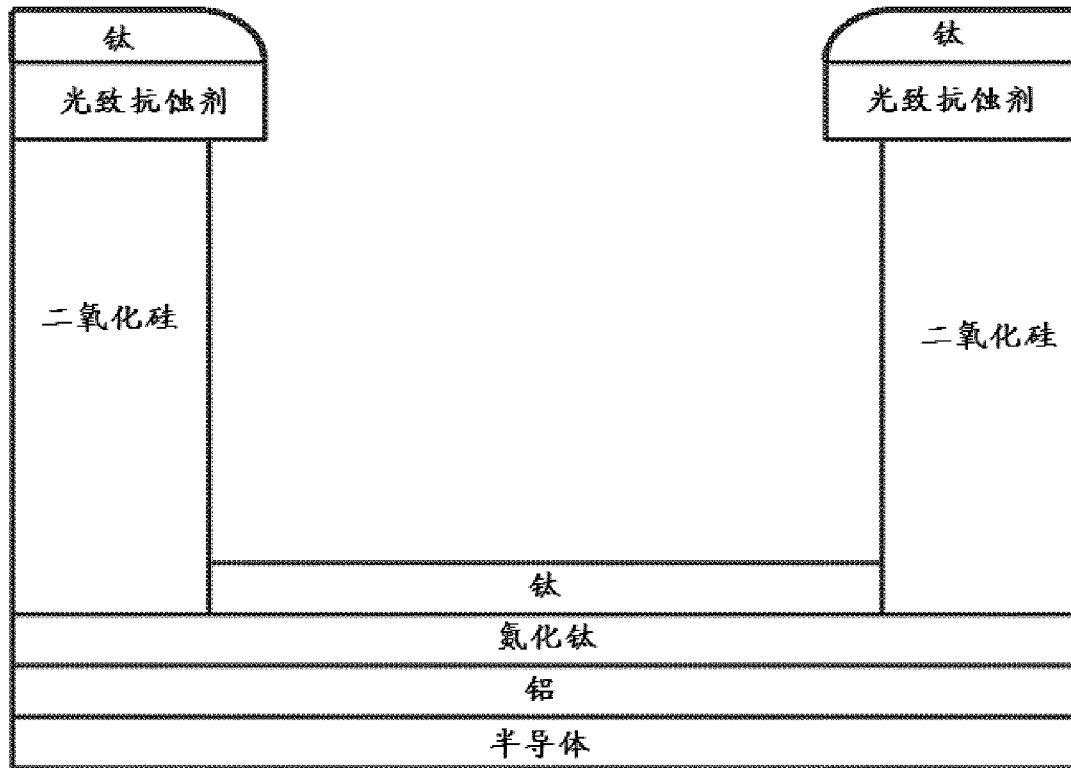


图 14

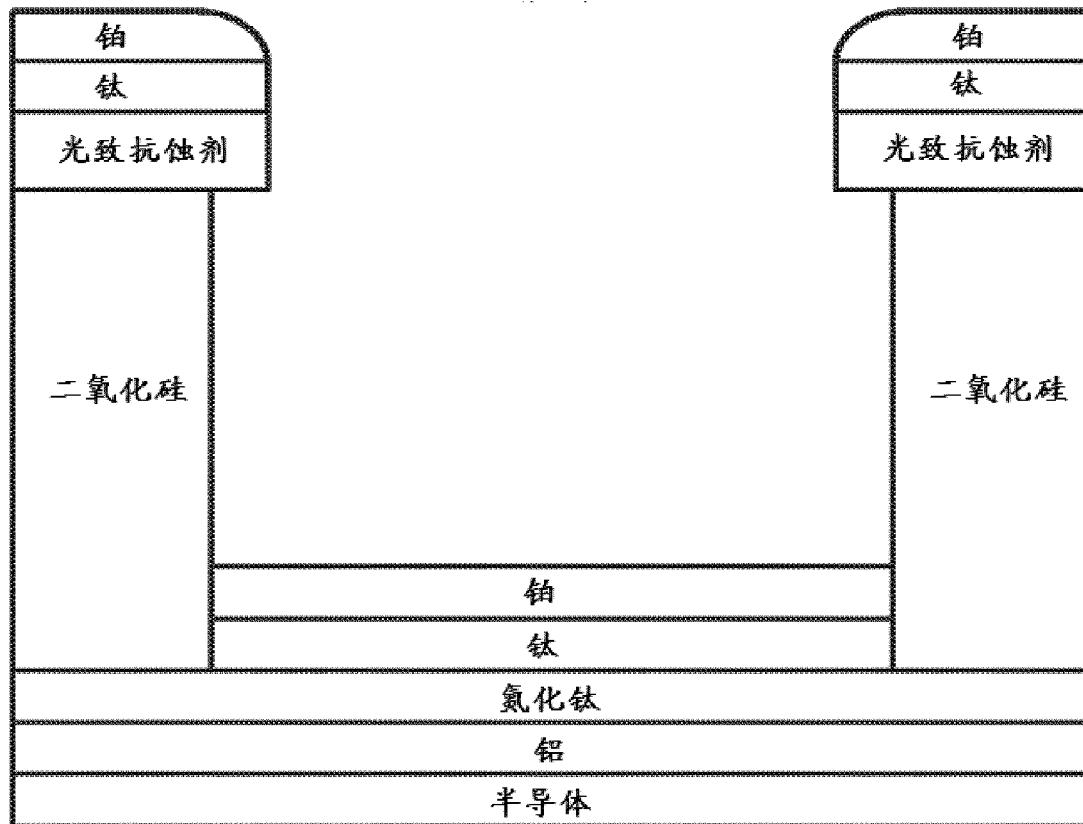


图 15

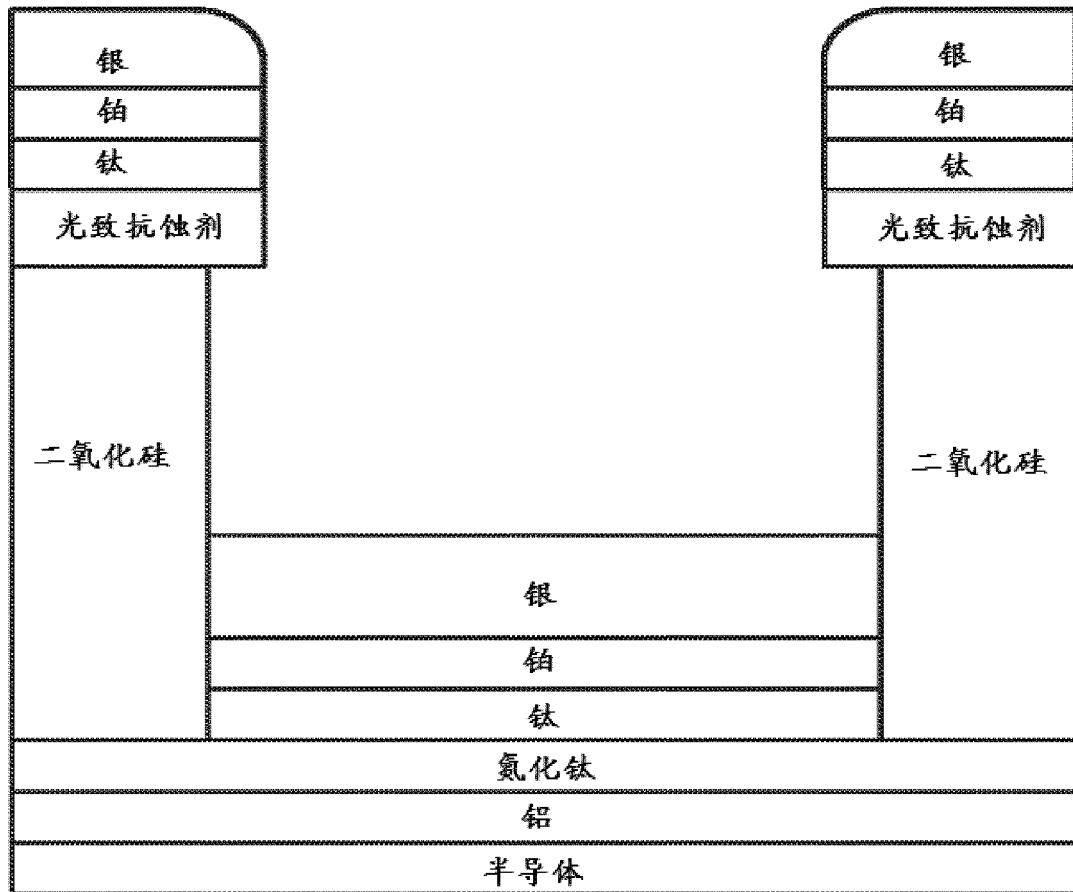


图 16

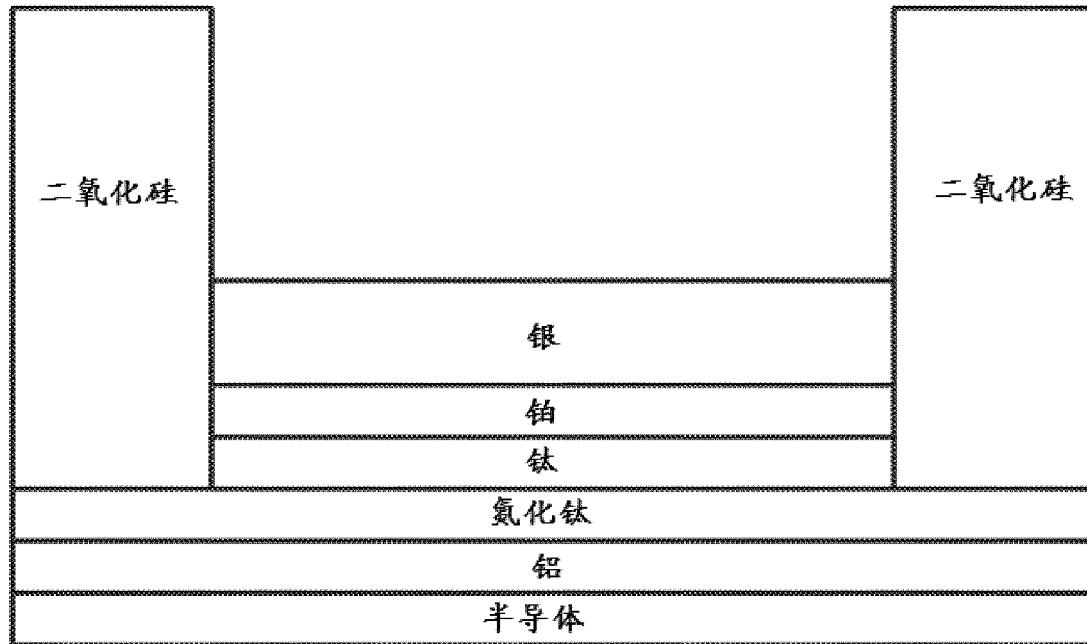


图 17

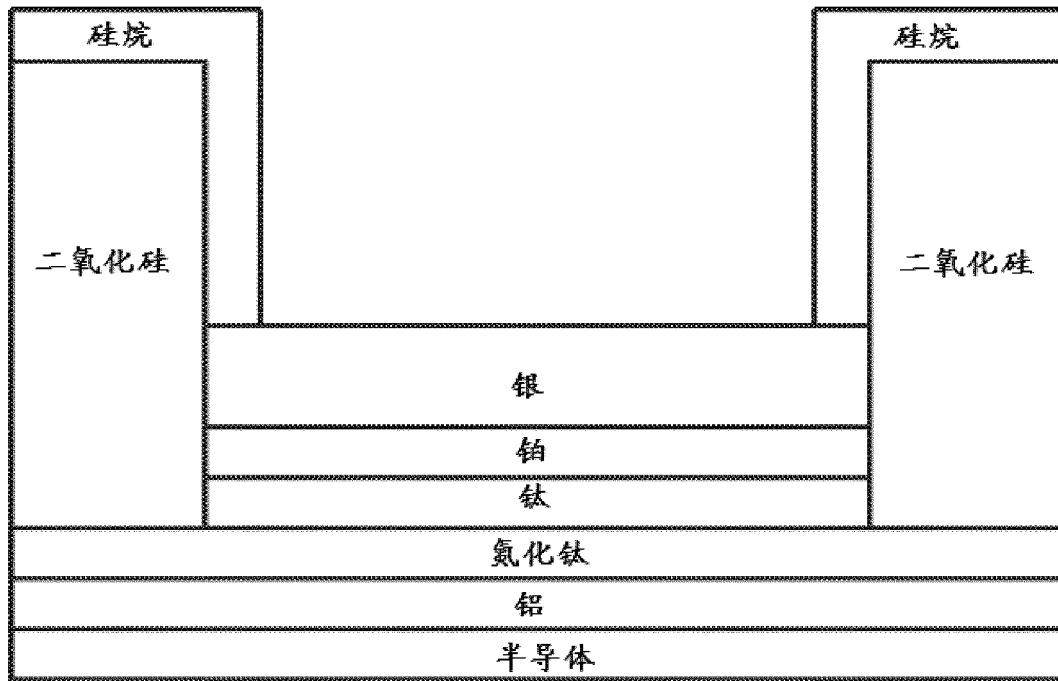


图 18

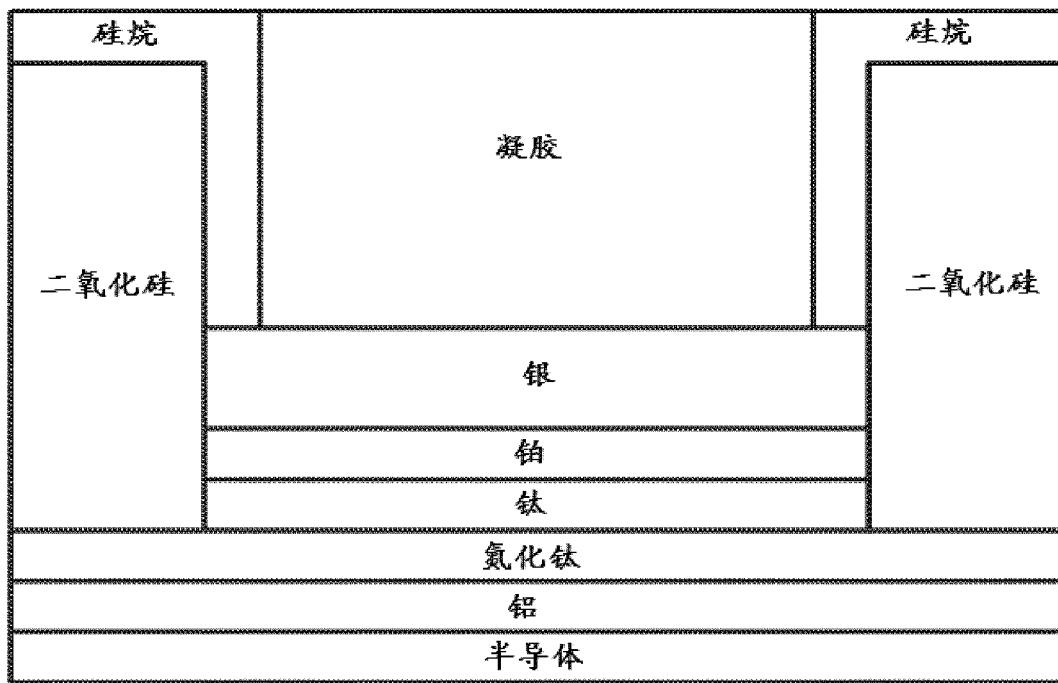


图 19

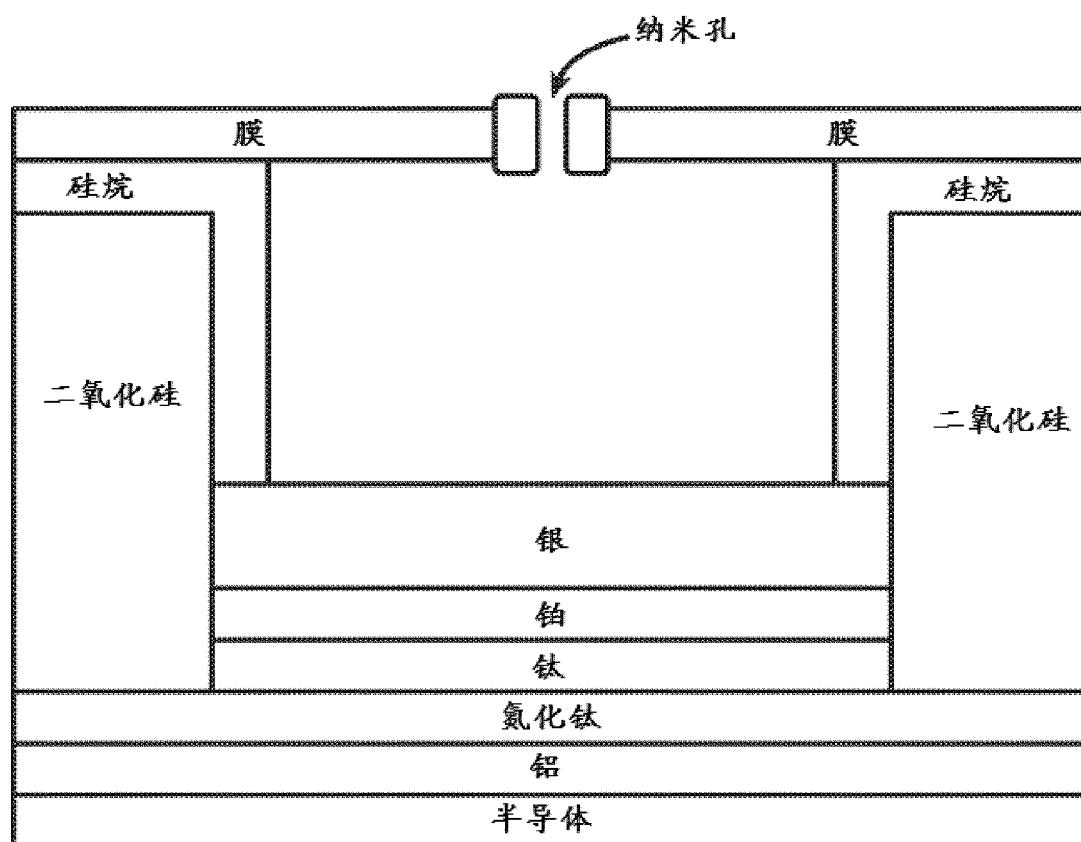


图 20

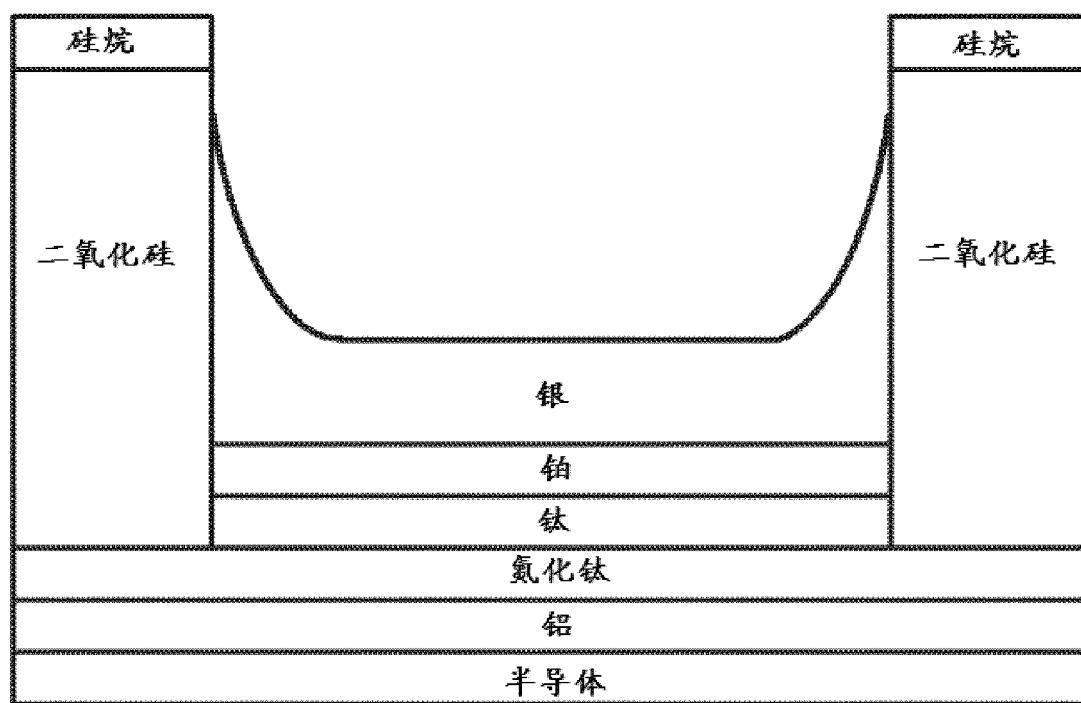


图 21

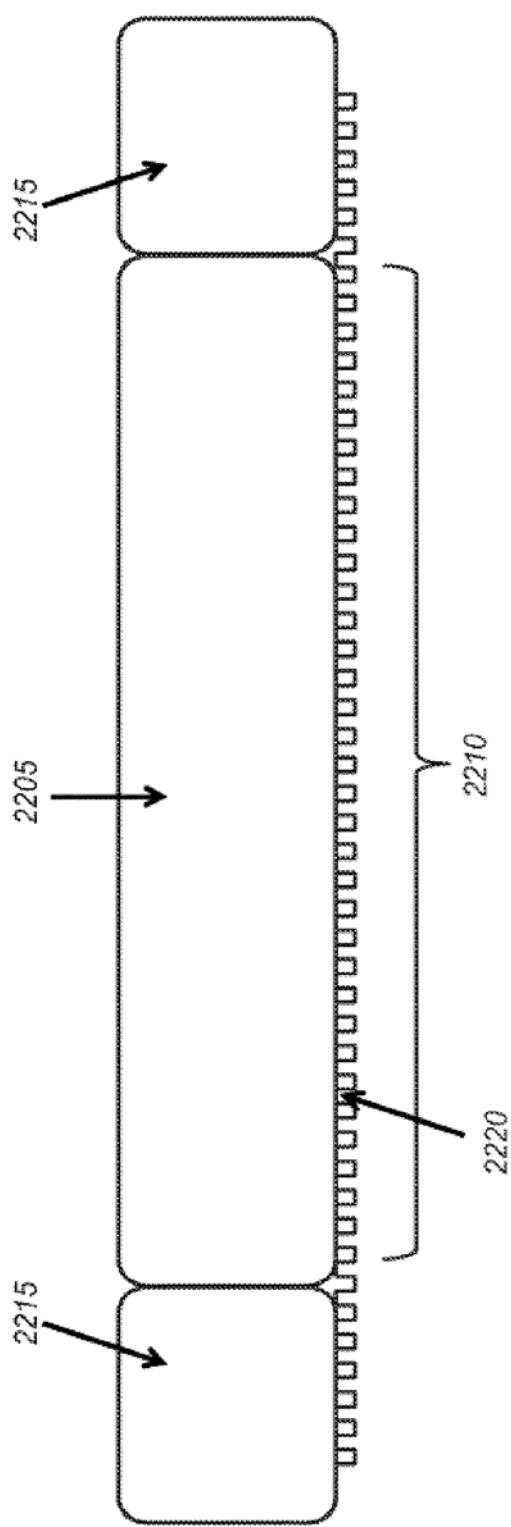


图 22

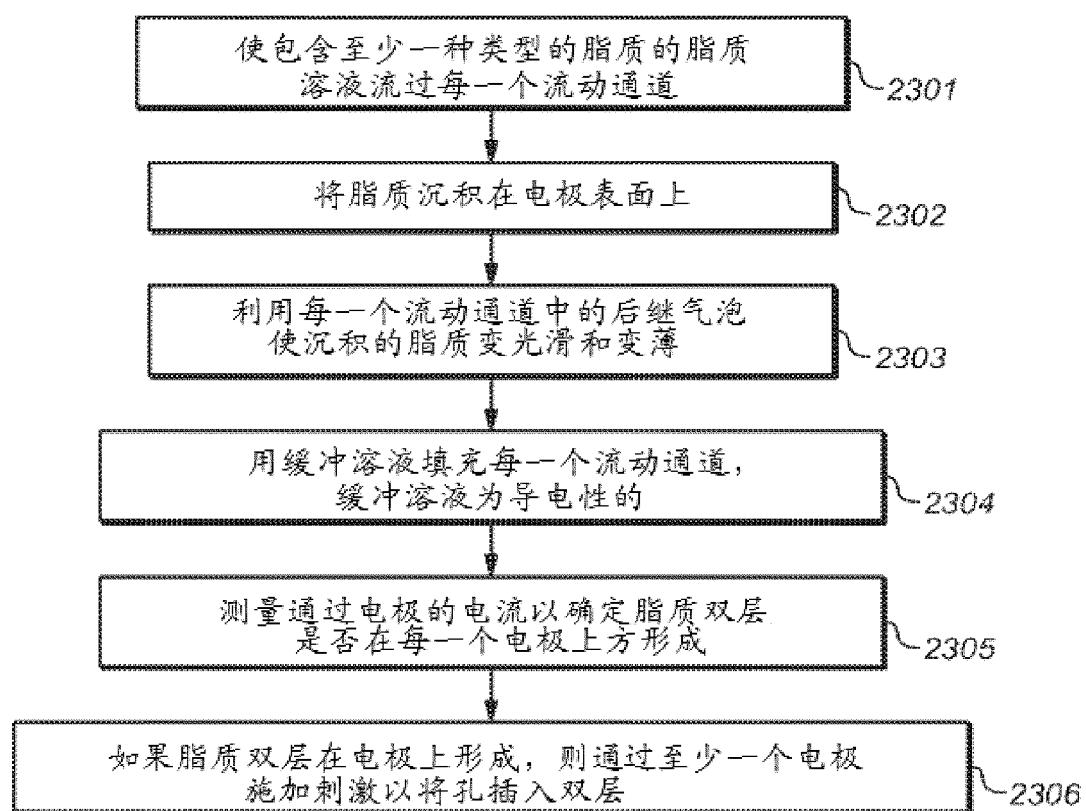


图 23

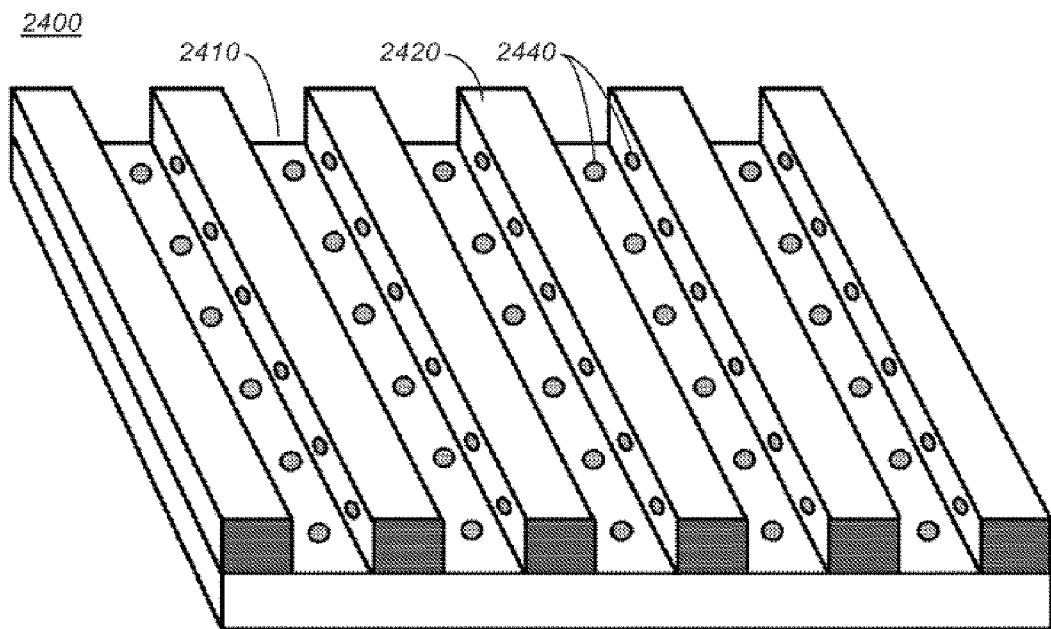


图 24

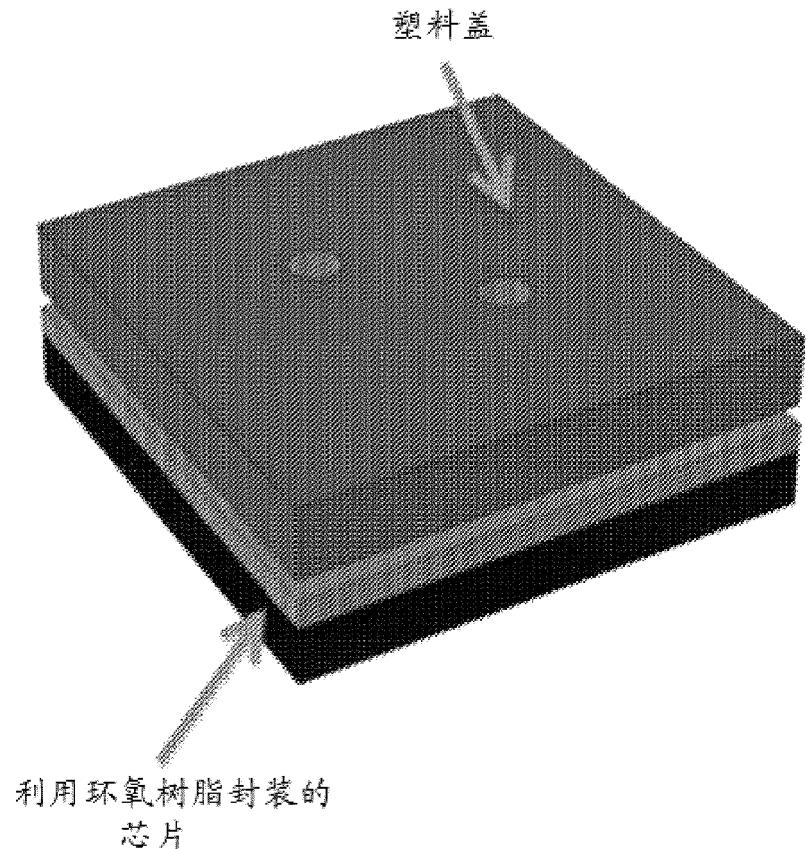


图 25A

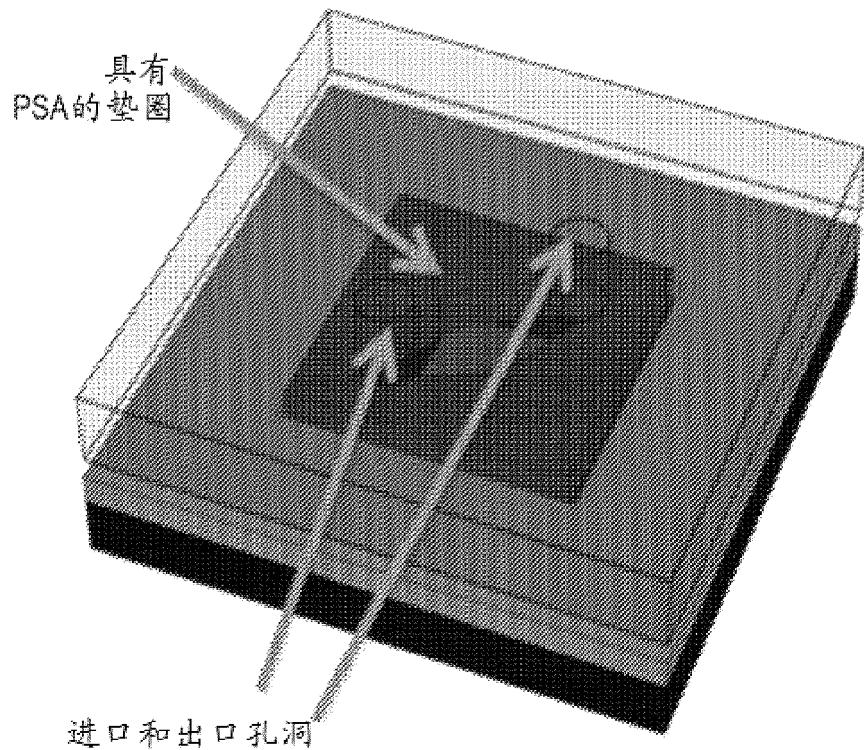
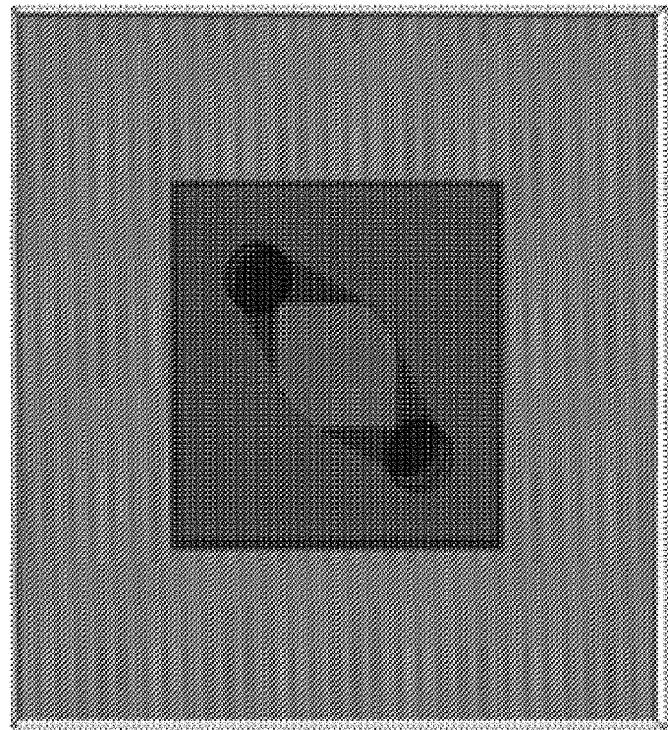


图 25B

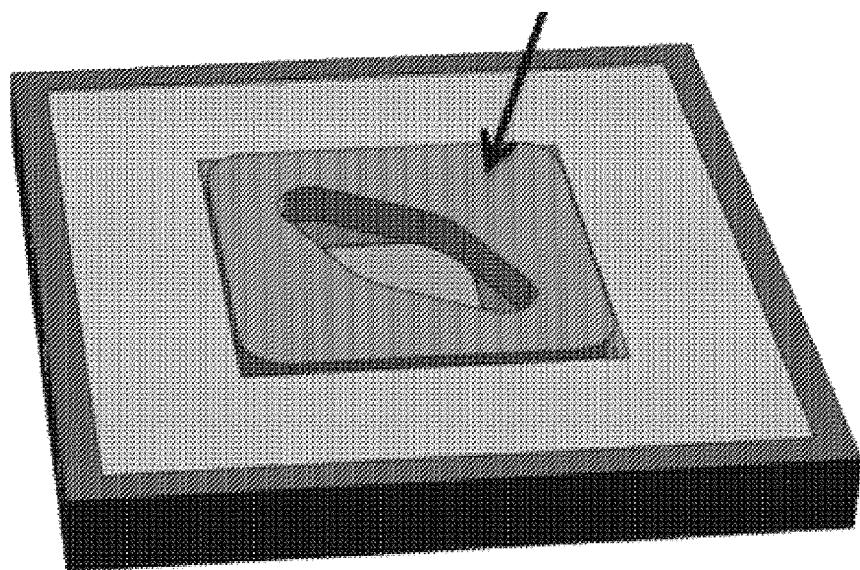
顶视图



活性电极区域的部分为盖子(无活性的)

图 25C

在两侧上具有
PSA 的垫圈



封装的芯片

图 26

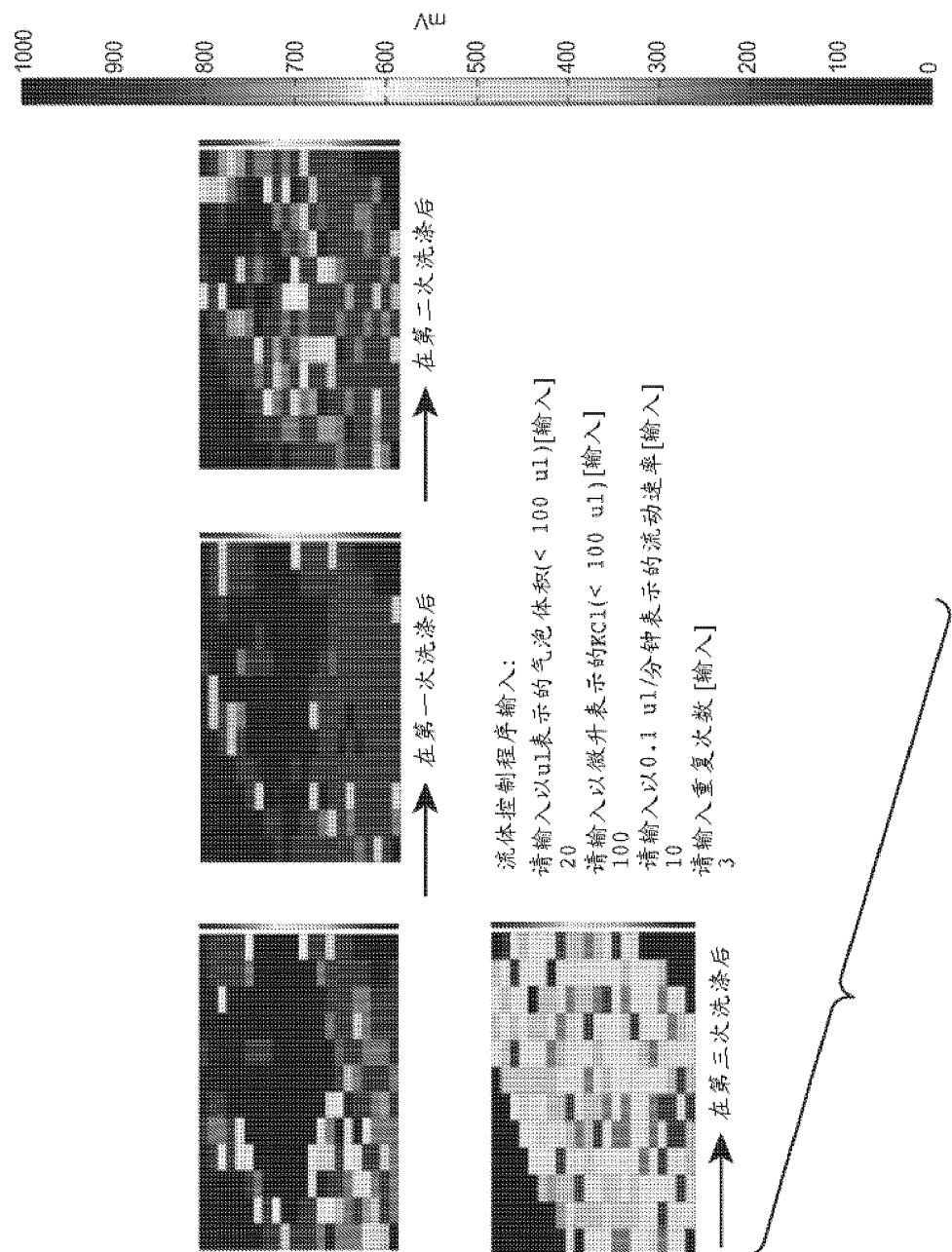


图 27

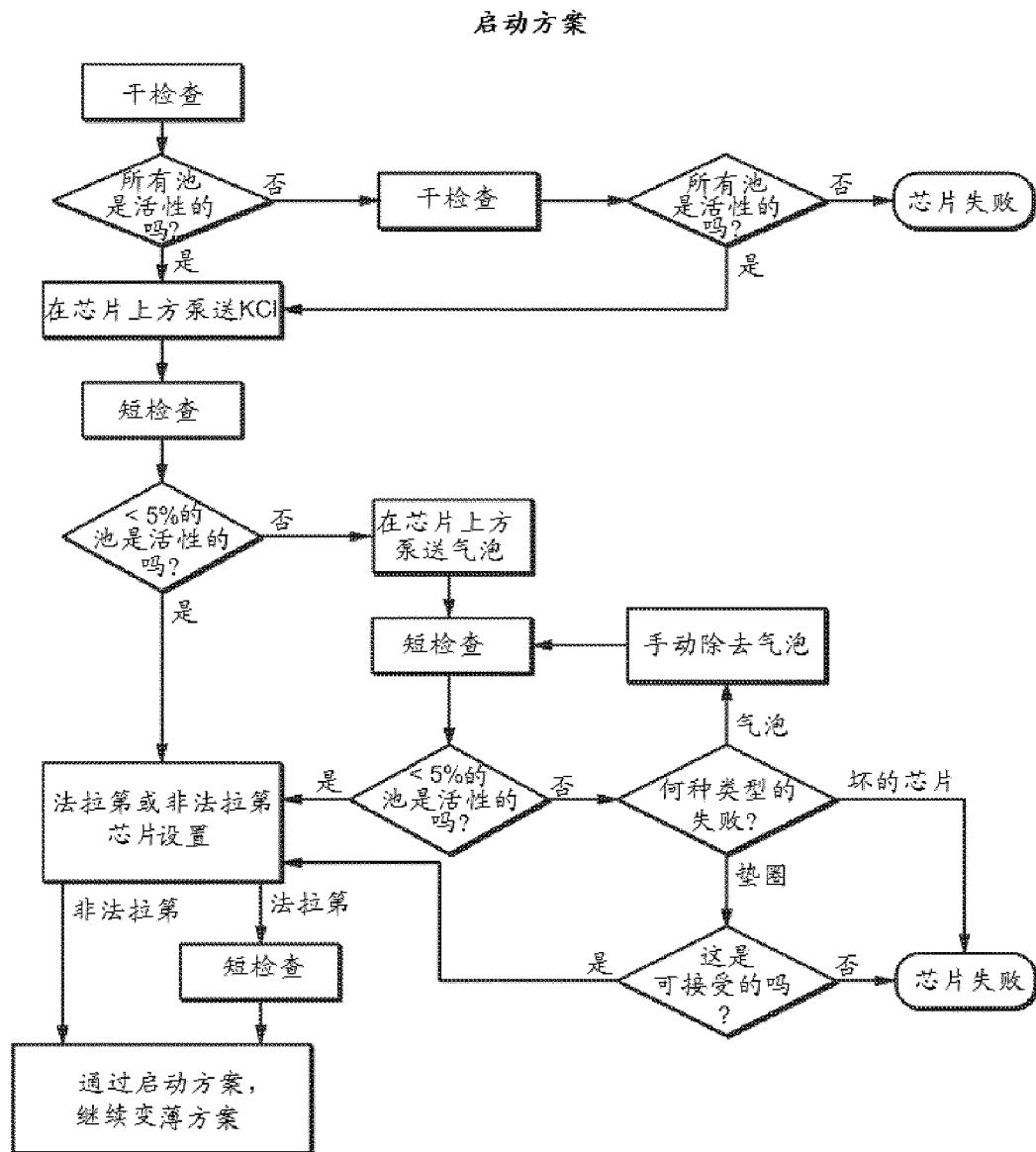


图 28

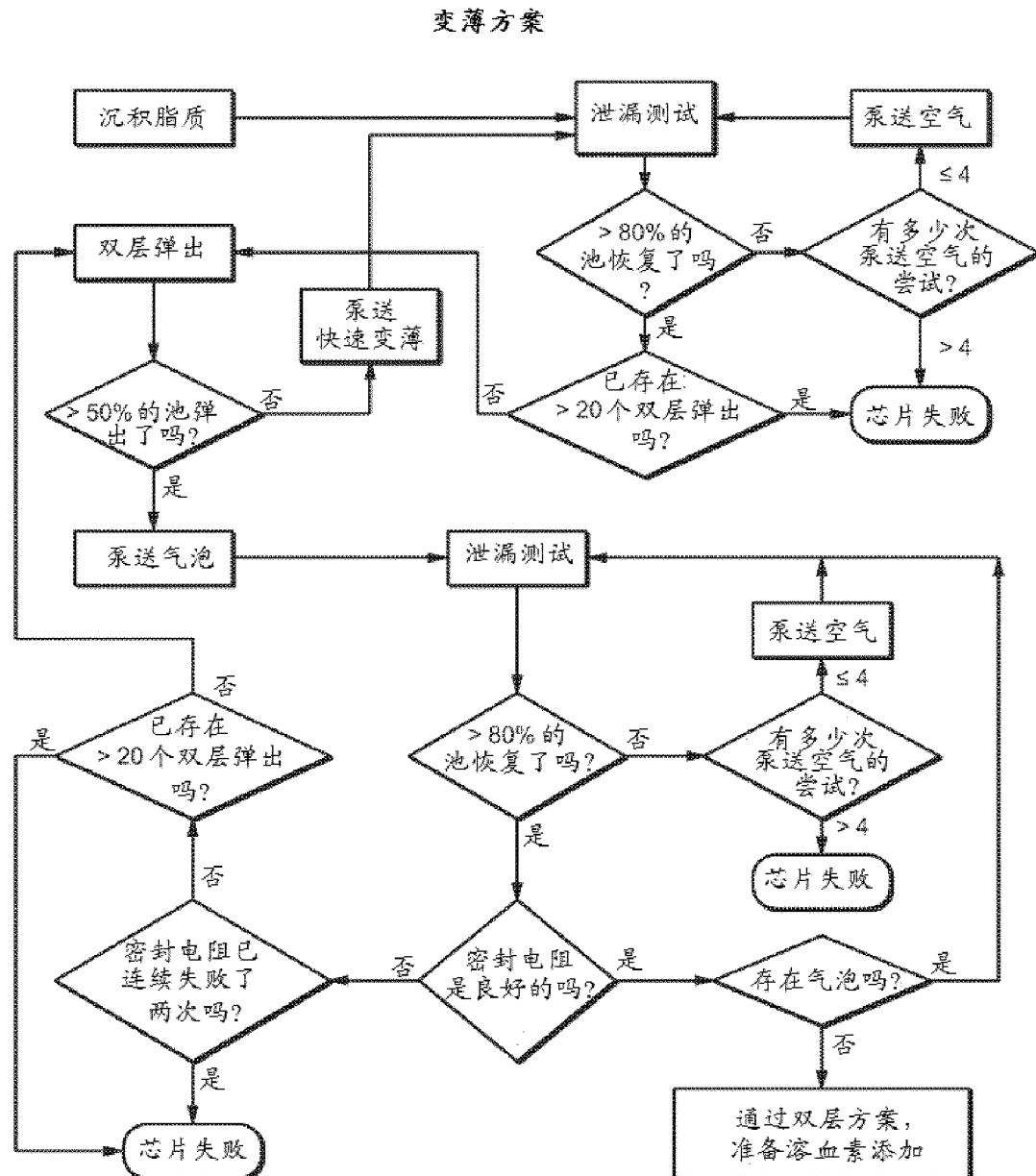


图 29

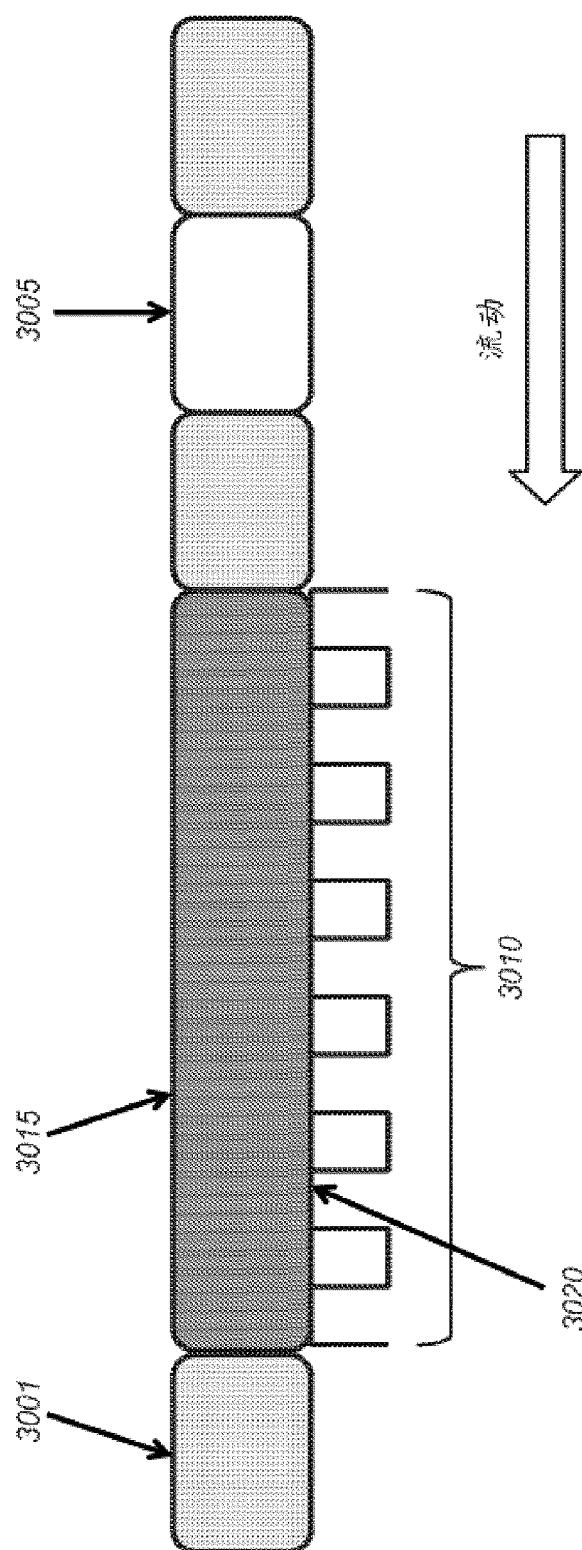


图 30