(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119013093 A
(43)申请公布日 2024.11.22

(21)申请号 202380031551.1

(22)申请日 2023.03.30

(30)优先权数据
63/325,726 2022.03.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/058383 2023.03.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/187104 EN 2023.10.05

(71)申请人 伊鲁米纳公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 A·里奇兹 A·康德-冈萨雷斯
O·厄特利 C·瓦科涅
D·加罗尔迪尼
M·A·阿莱曼·加西亚
Y·维波娜 I·科克西斯

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 李勇 徐一琨

(51)Int.Cl.
B01D 69/14(2006.01)
C12Q 1/6869(2006.01)

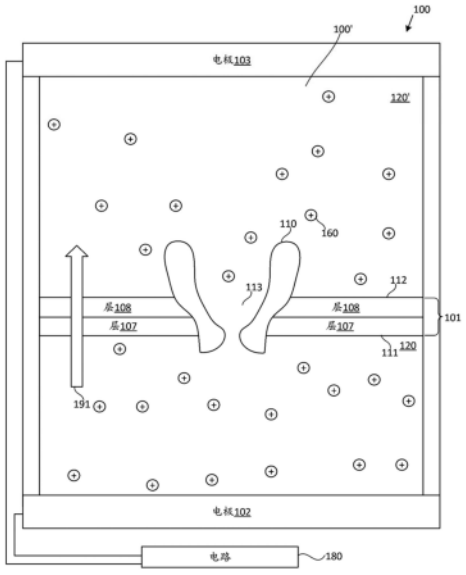
权利要求书4页 说明书44页 附图16页

(54)发明名称

包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的纳米孔装置以及制造该纳米孔装置的方法

(57)摘要

本文提供了包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的纳米孔装置以及制造该纳米孔装置的方法。在一些示例中,由限定孔口的屏障支撑物悬挂在第一流体和第二流体之间的屏障。该屏障可包括跨该孔口悬挂并且包含嵌段共聚物的分子的一个或多个层。该嵌段共聚物的每个分子可包括一个或多个具有大约长度A的亲水性嵌段和一个或多个具有大约长度B的疏水性嵌段。亲水性嵌段可形成该屏障的外表面,并且疏水性嵌段可位于该屏障内。该疏水性嵌段可包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯(polymyrcene)、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。



CN 119013093 A

1.一种在第一流体和第二流体之间的屏障,所述屏障由限定孔口的屏障支撑物悬挂,所述屏障包括:

跨所述孔口悬挂并且包含嵌段共聚物的分子的一个或多个层,

所述嵌段共聚物的每个分子包括一个或多个具有大约长度A的亲水性嵌段和一个或多个具有大约长度B的疏水性嵌段,

所述亲水性嵌段形成所述屏障的外表面,并且所述疏水性嵌段位于所述屏障内,

所述疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

2.根据权利要求1所述的屏障,其中所述嵌段共聚物是二嵌段共聚物。

3.根据权利要求2所述的屏障,其中所述疏水性嵌段是聚丁二烯(PBd)。

4.根据权利要求2或权利要求3所述的屏障,其中所述屏障具有大约2A+2B的厚度。

5.根据权利要求1所述的屏障,其中所述嵌段共聚物是具有两个亲水性嵌段和一个疏水性嵌段的三嵌段共聚物。

6.根据权利要求5所述的屏障,其中所述疏水性嵌段是聚(异丁烯)(PIB)。

7.根据权利要求5或权利要求6所述的屏障,其中所述屏障具有大约2A+B的厚度。

8.根据权利要求1所述的屏障,其中所述嵌段共聚物是具有两个疏水性嵌段和一个亲水性嵌段的三嵌段共聚物。

9.根据权利要求8所述的屏障,其中所述屏障具有大约A+2B的厚度。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的屏障,还包括设置在其中并且提供所述第一流体和所述第二流体之间的接触的纳米孔。

11.一种在第一流体和第二流体之间的屏障,所述屏障由限定孔口的屏障支撑物悬挂,所述屏障包括:

跨所述孔口悬挂并且包含嵌段共聚物的分子的一个或多个层,

所述嵌段共聚物的每个分子包括第一和第二亲水性嵌段以及设置在所述第一和第二亲水性嵌段之间的疏水性嵌段,

所述第一和第二亲水性嵌段形成所述屏障的外表面,并且所述疏水性嵌段位于所述屏障内;和

设置在所述屏障内并且提供所述第一流体和所述第二流体之间的接触的纳米孔。

12.根据权利要求11所述的屏障,其中所述第一和第二亲水性嵌段的长度大约为A,所述疏水性嵌段的长度大约为B,所述一个或多个层的至少一部分具有大约2A+B的厚度,并且所述屏障具有大约2A+B的厚度。

13.根据权利要求12所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约100个重复单元。

14.根据权利要求12或权利要求13所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约100个重复单元。

15.根据权利要求11至14中任一项所述的屏障,其中所述疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

16.根据权利要求11至15中任一项所述的屏障,其中所述第一和第二亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。

17.根据权利要求11至16中任一项所述的屏障,其中所述疏水性嵌段包括具有小于约0℃的玻璃化转变温度(T_g)的聚合物。

18.根据权利要求11至16中任一项所述的屏障,其中所述第一和第二亲水性嵌段中的至少一者包括选自由以下项组成的组的部分:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。

19.根据权利要求18所述的屏障,其中所述第一亲水性嵌段的所述部分包括甲基或羧基,并且其中所述第二亲水性嵌段的所述部分包括甲基或羧基。

20.根据权利要求11至19中任一项所述的屏障,其中所述分子还包括将所述第一亲水性嵌段偶联至所述疏水性嵌段的第一末端的第一接头,和将所述第二亲水性嵌段偶联至所述疏水性嵌段的第二末端的第二接头。

21.一种在第一流体和第二流体之间的屏障,所述屏障包括:

第一层,所述第一层包含二嵌段共聚物的第一多个分子,

所述二嵌段共聚物的每个分子包括与亲水性嵌段偶联的疏水性嵌段;和

第二层,所述第二层包含所述二嵌段共聚物的第二多个分子,

所述第一多个分子的所述亲水性嵌段形成所述屏障的第一外表面,所述第二多个分子的所述亲水性嵌段形成所述屏障的第二外表面,并且

所述第一和第二多个分子的所述疏水性嵌段在所述屏障内彼此接触。

22.根据权利要求21所述的屏障,其中所述亲水性嵌段的长度大约为A,所述疏水性嵌段的长度大约为B,所述第一层和第二层各自具有大约A+B的厚度,并且所述屏障具有大约2A+2B的厚度。

23.根据权利要求22所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约100个重复单元。

24.根据权利要求22或权利要求23所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约100个重复单元。

25.根据权利要求21至24中任一项所述的屏障,其中所述亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。

26.根据权利要求21至25中任一项所述的屏障,其中所述疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

27.根据权利要求21至26中任一项所述的屏障,所述分子中的每个分子还包括将所述疏水性嵌段偶联至所述亲水性嵌段的接头。

28.根据权利要求27所述的屏障,其中所述接头包括至少一个选自由以下项组成的组的部分:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

29.根据权利要求21至28中任一项所述的屏障,其中所述第一和第二亲水性嵌段各自

包括独立地选自由以下项组成的组的部分:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。

30.根据权利要求21至29中任一项所述的屏障,还包括设置在所述屏障内并且提供将所述第一流体和所述第二流体流体联接的孔口的纳米孔。

31.一种在第一流体和第二流体之间的屏障,所述屏障包括:

第一层,所述第一层包含三嵌段共聚物的第一多个分子,

所述三嵌段共聚物的每个分子包括第一和第二疏水性嵌段以及设置在所述第一和第二疏水性嵌段之间的亲水性嵌段;和

第二层,所述第二层包含所述三嵌段共聚物的第二多个分子,

所述第一多个分子的所述亲水性嵌段形成所述屏障的第一外表面,所述第二多个分子的所述亲水性嵌段形成所述屏障的第二外表面,并且

所述第一和第二多个分子的所述疏水性嵌段在所述屏障内彼此接触。

32.根据权利要求31所述的屏障,其中所述亲水性嵌段的长度大约为A,每个疏水性嵌段的长度大约为B,所述第一层和第二层各自具有大约A/2+B的厚度,并且所述屏障具有大约A+2B的厚度。

33.根据权利要求32所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约100个重复单元。

34.根据权利要求32或权利要求33所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约100个重复单元。

35.根据权利要求31至34中任一项所述的屏障,其中所述亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。

36.根据权利要求31至35中任一项所述的屏障,其中所述疏水性嵌段各自包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

37.根据权利要求31至37中任一项所述的屏障,所述第一和第二多个分子的所述分子中的每个分子还包括将每个疏水性嵌段偶联至所述亲水性嵌段的接头。

38.根据权利要求37所述的屏障,其中所述接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

39.根据权利要求31至38中任一项所述的屏障,其中所述亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的部分:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。

40.根据权利要求31至39中任一项所述的屏障,还包括设置在所述屏障内并且提供将所述第一流体和所述第二流体流体联接的孔口的纳米孔。

41.一种制造屏障的方法,所述方法包括:

形成在第一和第二流体之间的屏障,所述屏障由限定孔口的屏障支撑物悬挂,所述屏障包括:

跨所述孔口悬挂并且包含嵌段共聚物的分子的一个或多个层,

所述嵌段共聚物的每个分子包括一个或多个具有大约长度A的亲水性嵌段和一个或多个具有大约长度B的疏水性嵌段，

所述一个或多个亲水性嵌段形成所述屏障的外表面，并且所述疏水性嵌段位于所述屏障内，

所述一个或多个疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物：聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

42.根据权利要求41所述的方法，其中使用涂布来形成所述屏障。

43.根据权利要求42所述的方法，其中所述涂布选自由以下项组成的组：刷涂、机械涂布和气泡涂布。

44.根据权利要求41至43中任一项所述的方法，其中所述一个或多个亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物：N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。

45.根据权利要求41至44中任一项所述的方法，还包括将纳米孔插入到所述屏障中。

46.根据权利要求45所述的方法，其中所述纳米孔提供所述第一流体和所述第二流体之间的接触。

47.根据权利要求45或权利要求46所述的方法，其中所述纳米孔被插入到所述屏障电穿孔、移液泵循环或洗涤剂辅助的孔插入中。

48.根据权利要求41至47中任一项所述的方法，其中所述嵌段共聚物是二嵌段共聚物。

49.根据权利要求41至47中任一项所述的方法，其中所述嵌段共聚物是具有两个亲水性嵌段和一个疏水性嵌段的三嵌段共聚物。

50.根据权利要求41至47中任一项所述的方法，其中所述嵌段共聚物是具有两个疏水性嵌段和一个亲水性嵌段的三嵌段共聚物。

包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的纳米孔装置以及制造该纳米孔装置的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年3月31日提交的名称为“NANOPORE DEVICES INCLUDING BARRIERS USING DIBLOCK OR TRIBLOCK COPOLYMERS,AND METHODS OF MAKING THE SAME”的美国临时专利申请号63/325,726的权益,该专利申请的全部内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及包括嵌段共聚物的屏障。

背景技术

[0004] 大量的学术和公司时间和能量已被投入到使用纳米孔对多核苷酸进行测序。例如,已经测量了DNA与DNA聚合酶I的克列诺片段(KF)在施加的电场中的纳米孔顶部的复合物的停留时间。或者,例如,电流或通量测量传感器已经用于涉及在α-溶血素纳米孔中捕获的DNA的实验中。或者,例如,当在α-溶血素纳米孔顶部的电场中捕获时,KF-DNA复合物已经基于它们的性质进行了区分。在另一个示例中,使用单一聚合酶复合物和溶液中的核苷酸类似物执行多核苷酸测序,该单一聚合酶复合物包括聚合酶和附接在纳米孔近侧的模板核酸。核苷酸类似物包括电荷封闭标记,其与核苷酸类似物的多磷酸部分附接,使得当核苷酸类似物掺入正在合成的多核苷酸中时,电荷封闭标记裂解。通过纳米孔检测电荷封闭标记,以确定所掺入的核苷酸的存在和身份,从而确定模板多核苷酸的序列。在其他示例中,构建体包括跨膜蛋白孔亚单位和核酸处理酶。

[0005] 然而,此类先前已知的装置、系统和方法可能未必足够稳健、可重复或灵敏,并且可能不具有用于实际实施的足够高的通量,例如,要求商业应用诸如临床中的基因组测序以及要求成本有效且高度准确的操作的其他环境。因此,所需要的是用于对多核苷酸进行测序的改进的装置、系统和方法,其可包括使用其中设置有纳米孔的膜。

发明内容

[0006] 本文提供了包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的纳米孔装置以及制造该纳米孔装置的方法。

[0007] 本文的一些示例提供了在第一流体和第二流体之间的屏障。该屏障可由限定孔口的屏障支撑物悬挂。该屏障可包括跨该孔口悬挂并且包含嵌段共聚物的分子的一个或多个层。该嵌段共聚物的每个分子包括一个或多个具有大约长度A的亲水性嵌段和一个或多个具有大约长度B的疏水性嵌段。亲水性嵌段可形成该屏障的外表面,并且疏水性嵌段可位于该屏障内。在一些示例中,疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

[0008] 在一些示例中,嵌段共聚物是二嵌段共聚物。在一些示例中,疏水性嵌段是聚丁二

烯(PBd)。附加地或另选地,在一些示例中,屏障具有大约2A+2B的厚度。

[0009] 在一些示例中,嵌段共聚物是具有两个亲水性嵌段和一个疏水性嵌段的三嵌段共聚物。在一些示例中,疏水性嵌段是聚(异丁烯)(PIB)。附加地或另选地,在一些示例中,屏障具有大约2A+B的厚度。

[0010] 在一些示例中,嵌段共聚物是具有两个疏水性嵌段和一个亲水性嵌段的三嵌段共聚物。在一些示例中,屏障具有大约A+2B的厚度。

[0011] 在一些示例中,屏障还包括设置在其中并且提供第一流体和第二流体之间的接触的纳米孔。

[0012] 本文的一些示例提供了在第一流体和第二流体之间的屏障。该屏障可由限定孔口的屏障支撑物悬挂。该屏障可包括跨该孔口悬挂并且包含嵌段共聚物的分子的一个或多个层。嵌段共聚物的每个分子可包括第一和第二亲水性嵌段以及设置在第一和第二亲水性嵌段之间的疏水性嵌段。该第一和第二亲水性嵌段可形成该屏障的外表面,并且该疏水性嵌段可位于该屏障内。屏障还可包括设置在该屏障内并且提供第一流体和第二流体之间的接触的纳米孔。

[0013] 在一些示例中,第一和第二亲水性嵌段的长度大约为A,疏水性嵌段的长度大约为B,该一个或多个层的至少一部分具有大约2A+B的厚度,并且屏障具有大约2A+B的厚度。在一些示例中,长度A为约2个重复单元至约100个重复单元。附加地或另选地,长度B为约2个重复单元至约100个重复单元。

[0014] 在一些示例中,疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

[0015] 在一些示例中,第一和第二亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。

[0016] 在一些示例中,疏水性嵌段包括具有小于约0℃的玻璃化转变温度(T_g)的聚合物。

[0017] 在一些示例中,第一和第二亲水性嵌段中的至少一者包括选自由以下项组成的组的部分:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。

[0018] 在一些示例中,第一亲水性嵌段的部分包括甲基或羧基,并且其中第二亲水性嵌段的部分包括甲基或羧基。

[0019] 在一些示例中,该分子还包括将第一亲水性嵌段偶联至疏水性嵌段的第一末端的第一接头,和将第二亲水性嵌段偶联至疏水性嵌段的第二末端的第二接头。

[0020] 本文的一些示例提供了在第一流体和第二流体之间的屏障。该屏障可包括第一层,该第一层包含二嵌段共聚物的第一多个分子。二嵌段共聚物的每个分子可包括与亲水性嵌段偶联的疏水性嵌段。该屏障还可包括第二层,该第二层包含该二嵌段共聚物的第二多个分子。该第一多个分子的亲水性嵌段可形成该屏障的第一外表面,该第二多个分子的亲水性嵌段可形成该屏障的第二外表面,并且该第一和第二多个分子的疏水性嵌段可在该屏障内彼此接触。

[0021] 在一些示例中,亲水性嵌段的长度大约为A,疏水性嵌段的长度大约为B,第一层和第二层各自具有大约A+B的厚度,并且屏障具有大约2A+2B的厚度。在一些示例中,长度A为

约2个重复单元至约100个重复单元。附加地或另选地,长度B为约2个重复单元至约100个重复单元。

[0022] 在一些示例中,亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。

[0023] 在一些示例中,疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

[0024] 在一些示例中,该分子中的每个分子还包括将疏水性嵌段偶联至亲水性嵌段的接头。

[0025] 在一些示例中,接头包括至少一个选自由以下项组成的组的部分:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0026] 在一些示例中,第一和第二亲水性嵌段各自包括独立地选自由以下项组成的组的部分:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。

[0027] 在一些示例中,屏障还包括设置在该屏障内并且提供将第一流体和第二流体流体联接的孔口的纳米孔。

[0028] 本文的一些示例提供了在第一流体和第二流体之间的屏障。该屏障可包括第一层,该第一层包含三嵌段共聚物的第一多个分子。三嵌段共聚物的每个分子可包括第一和第二疏水性嵌段以及设置在第一和第二疏水性嵌段之间的亲水性嵌段。该屏障还可包括第二层,该第二层包含该三嵌段共聚物的第二多个分子。该第一多个分子的亲水性嵌段可形成该屏障的第一外表面,该第二多个分子的亲水性嵌段可形成该屏障的第二外表面,并且该第一和第二多个分子的疏水性嵌段可在该屏障内彼此接触。

[0029] 在一些示例中,亲水性嵌段的长度大约为A,每个疏水性嵌段的长度大约为B,第一层和第二层各自具有大约A/2+B的厚度,并且屏障具有大约A+2B的厚度。在一些示例中,长度A为约2个重复单元至约100个重复单元。附加地或另选地,长度B为约2个重复单元至约100个重复单元。

[0030] 在一些示例中,亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。

[0031] 在一些示例中,疏水性嵌段各自包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

[0032] 在一些示例中,第一多个分子和第二多个分子的分子中的每个分子还包括将每个疏水性嵌段偶联至亲水性嵌段的接头。在一些示例中,接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0033] 在一些示例中,亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的部分:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。

[0034] 在一些示例中,屏障还包括设置在该屏障内并且提供将第一流体和第二流体流体联接的孔口的纳米孔。

[0035] 本文的一些示例提供了一种形成屏障的方法。该方法可包括形成在第一流体和第二流体之间的屏障,该屏障由限定孔口的屏障支撑物悬挂。该屏障可包括跨该孔口悬挂并且包含嵌段共聚物的分子的一个或多个层。该嵌段共聚物的每个分子可包括一个或多个具有大约长度A的亲水性嵌段和一个或多个具有大约长度B的疏水性嵌段。亲水性嵌段可形成该屏障的外表面,并且疏水性嵌段可位于该屏障内。在一些示例中,该一个或多个疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

[0036] 在一些示例中,使用涂布来形成屏障。在一些示例中,涂布选自由以下项组成的组:刷涂、机械涂布和气泡涂布。

[0037] 在一些示例中,该一个或多个亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。

[0038] 在一些示例中,该方法还包括将纳米孔插入到屏障中。在一些示例中,纳米孔提供第一流体和第二流体之间的接触。附加地或另选地,在一些示例中,纳米孔可以被插入到屏障电穿孔、移液泵循环或洗涤剂辅助的孔插入中。

[0039] 在一些示例中,嵌段共聚物是二嵌段共聚物。

[0040] 在一些示例中,嵌段共聚物是具有两个亲水性嵌段和一个疏水性嵌段的三嵌段共聚物。

[0041] 在一些示例中,嵌段共聚物是具有两个疏水性嵌段和一个亲水性嵌段的三嵌段共聚物。

[0042] 应理解,如本文中所描述的本公开的方面中的每一者的任何相应特征/示例可以任何适当组合一起实施,并且来自这些方面中的任一者或多者的任何特征/示例可以与如本文中所描述的其他(多个)方面的特征中的任一者以任何适当组合一起实施,以实现如本文中所描述的益处。

附图说明

[0043] 图1示意性地示出了包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的示例性纳米孔组合物和装置的剖视图。

[0044] 图2A至图2C示意性地示出了使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障,这些共聚物可被包含在图1的纳米孔组合物和装置中。

[0045] 图3A至图3C示意性地示出了用于制备三嵌段共聚物的示例性方案,该三嵌段共聚物用于图1的纳米孔组合物和装置。

[0046] 图4示意性地示出了图1的组合物和装置的示例性用途的剖视图。

[0047] 图5示意性地示出了图1的组合物和装置的另一示例性用途的剖视图。

[0048] 图6示意性地示出了图1的组合物和装置的另一示例性用途的剖视图。

[0049] 图7示意性地示出了图1的组合物和装置的另一示例性用途的剖视图。

[0050] 图8示出了用于形成如图1所示的装置的操作的流程。

[0051] 图9示出了描述针对由DPhPC、PEO_{500}-b-PBd_{700}和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$形成的膜测量的电容和噪声的图和表格。

[0052] 图10示出了根据针对DPhPC、PEO_{500}-b-PBd_{700}和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$膜测量

的电压的剩余的膜的归一化数目的图。

[0053] 图11示出了在1M KCl+50mM HEPES缓冲液中MspA纳米孔/PEO_{500}-b-PBd_{700}膜构建体稳定性的图。

[0054] 图12示出了描述针对根据本文实施例形成的膜测量的击穿电压的图。

[0055] 图13示出了在某些条件下MspA纳米孔/膜构建体稳定性的图。

[0056] 图14A至图14B示意性地示出了图1的纳米孔组合物和装置的一个非限制性示例的进一步细节的平面图和剖视图。

[0057] 图15示意性地示出了可在参考图14A至图14B描述的示例中使用的另选屏障。

[0058] 图16示意性地示出了可在参考图14A至图14B描述的示例中使用的另一另选屏障。

[0059] 图17示意性地示出了图1的组合物和装置的另一示例性用途的剖视图。

具体实施方式

[0060] 本文提供了包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的纳米孔装置以及制造该纳米孔装置的方法。

[0061] 例如,纳米孔测序可利用插入到屏障中并且包括孔口的纳米孔,离子和/或其他分子可通过该孔口从屏障的一侧流动到另一侧。电路可用于检测核苷酸序列,例如在合成测序(SBS)期间,其中在屏障的第一侧,聚合酶以基于生长的多核苷酸与其杂交的模板多核苷酸的序列的顺序将核苷酸添加到生长的多核苷酸中。可通过在屏障的相应侧上使用具有不同组成的流体,例如以在屏障的一侧上提供用于检测的合适电子传输,同时在屏障的另一侧上适当地促进聚合酶的活性,来提高电路的灵敏度。流体组成的差异可产生可能削弱屏障的渗透压,并因此增加在正常使用期间屏障可能破裂或泄漏的可能性。然而,可能难以将纳米孔插入到太强的屏障中。

[0062] 如本文所提供的,用于纳米孔装置中的屏障可包括为装置的长期使用提供合适的稳定性特征并且还促进纳米孔插入以便在生产期间增加可用装置的数目的二嵌段或三嵌段共聚物。如下文更详细解释的,在一些示例中,本发明二嵌段共聚物可包含与疏水性嵌段偶联的亲水性嵌段。可选择二嵌段共聚物中疏水和亲水性嵌段的相应长度,使得共聚物组装成双层结构,其中亲水性嵌段形成相应层的外表面(并且因此形成屏障的相应外表面),并且疏水性嵌段形成该层的内表面并接触另一层的疏水性嵌段。在其他示例中,本发明三嵌段共聚物可包含在两个疏水性嵌段之间偶联的亲水性嵌段。可选择三嵌段共聚物中疏水和亲水性嵌段的相应长度,使得共聚物组装成双层结构,其中亲水性嵌段形成相应层的外表面(并且因此形成屏障的相应外表面),并且疏水性嵌段形成该层的内表面并接触另一层的疏水性嵌段。在其他示例中,本发明三嵌段共聚物可包含在两个亲水性嵌段之间偶联的疏水性嵌段。可选择三嵌段共聚物中疏水和亲水性嵌段的相应长度,使得共聚物组装成结构,其中亲水性嵌段形成屏障的外表面,并且疏水性嵌段形成屏障的内部。

[0063] 首先,将简单地解释本文中所使用的一些术语。然后,将描述包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的一些示例性装置以及制造和使用该装置的方法。

[0064] 术语

[0065] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语的含义与本领域的普通技术人员通常理解的含义相同。术语“包含(including)”以及如“包含(include)”、“包含

(includes)”、和“包含(included)”等其他形式的使用不具限制性。术语“具有(having)”以及如“具有(have)”、“具有(has)”、和“具有(had)”等其他形式的使用不具限制性。如本说明书中所用,无论是在过渡短语中还是在权利要求的正文中,术语“包含”和“包括”都将被解释为具有开放式含义。即,上述术语应与短语“至少具有”或“至少包括”同义地解释。例如,当在过程的上下文中使用时,术语“包含”表示该过程至少包括所列举的步骤,但是也可包括额外步骤。当在化合物、组合物或系统的上下文中使用时,术语“包含”是指该化合物、组合物或系统至少包含所列举的特征或组分,但是也可包含额外特征或组分。

[0066] 如本文所用,除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代。

[0067] 贯穿本说明书使用的术语“基本上(substantially)”、“大约(approximately)”、和“约(about)”用于描述和说明如归因于加工中的变化的较小的波动。例如,它们可以指小于或等于±10%、如小于或等于±5%、如小于或等于±2%、如小于或等于±1%、如小于或等于±0.5%、如小于或等于±0.2%、如小于或等于±0.1%、如小于或等于±0.05%。

[0068] 如本文所用,术语“核苷酸(nucleotide)”旨在表示包含糖和至少一个磷酸酯基团,并且在一些示例中还包含核碱基的分子。缺乏核碱基的核苷酸可被称为“无碱基(abasic)”的。核苷酸包含脱氧核糖核苷酸、经修饰的脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核糖核苷酸、肽核苷酸、经修饰的肽核苷酸、经修饰的磷酸糖主链核苷酸、和它们的混合物。核苷酸的示例包含单磷酸腺苷(AMP)、二磷酸腺苷(ADP)、三磷酸腺苷(ATP)、单磷酸胸苷(TMP)、二磷酸胸苷(TDP)、三磷酸胸苷(TTP)、单磷酸胞苷(CMP)、二磷酸胞苷(CDP)、三磷酸胞苷(CTP)、单磷酸鸟苷(GMP)、二磷酸鸟苷(GDP)、三磷酸鸟苷(GTP)、单磷酸尿苷(UMP)、二磷酸尿苷(UDP)、三磷酸尿苷(UTP)、单磷酸脱氧腺苷(dAMP)、二磷酸脱氧腺苷(dADP)、三磷酸脱氧腺苷(dATP)、单磷酸脱氧胸苷(dTMP)、二磷酸脱氧胸苷(dTDP)、三磷酸脱氧胸苷(dTTP)、二磷酸脱氧胞苷(dCDP)、三磷酸脱氧胞苷(dCTP)、单磷酸脱氧鸟苷(dGMP)、二磷酸脱氧鸟苷(dGDP)、三磷酸脱氧鸟苷(dGTP)、单磷酸脱氧尿苷(dUMP)、二磷酸脱氧尿苷(dUDP)、和三磷酸脱氧尿苷(dUTP)。

[0069] 如本文所用,术语“核苷酸”也打算涵盖任何核苷酸类似物,该核苷酸类似物是包含与天然存在的核苷酸相比经修饰的核碱基、糖、主链和/或磷酸酯部分的类型的核苷酸。核苷酸类似物还可称为“经修饰的核酸”。示例性经修饰的核碱基包括肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、2-氨基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、2-硫代胞嘧啶、15-卤代尿嘧啶、15-卤代胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、8-卤代腺嘌呤或鸟嘌呤、8-氨基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-硫醇腺嘌呤或鸟嘌呤、8-硫烷基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-羟基腺嘌呤或鸟嘌呤、5-卤代取代的尿嘧啶或胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤、3-脱氮腺嘌呤等。如本领域中已知,某些核苷酸类似物无法掺入到多核苷酸中,例如核苷酸类似物诸如5’-磷酰硫酸腺苷。核苷酸可以包含任何适合数目的磷酸酯,例如三个、四个、五个、六个、或多于六个磷酸酯。核苷酸类似物还包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)和5-羟基丁炔-2’-脱氧尿苷(“超级T”)。

[0070] 如本文所用,术语“多核苷酸(polynucleotide)”是指包含彼此结合的核苷酸序列的分子。多核苷酸为聚合物的一个非限制性示例。多核苷酸的示例包括脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)和它们的类似物,诸如锁定核酸(LNA)和肽核酸(PNA)。多核苷酸可以是核苷酸的单链序列,如RNA或单链DNA;核苷酸的双链序列,如双链DNA;或可以包含核苷酸的单链和双链序列的混合物。双链DNA(dsDNA)包含基因组DNA、以及PCR和扩增产物。单链DNA(ssDNA)可以转化成dsDNA并且反之亦然。多核苷酸可包括非天然存在的DNA,诸如对映异构的DNA、LNA或PNA。多核苷酸中核苷酸的精确序列可为已知或未知的。以下为多核苷酸的示例:基因或基因片段(例如探针、引物、表达的序列标签(EST)或基因表达系列分析(SAGE)标签)、基因组DNA、基因组DNA片段、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、合成多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、前述任一者的核酸探针、引物、或扩增复本。

[0071] 如本文所用,“聚合酶(polymerase)”旨在表示具有通过将核苷酸聚合成多核苷酸来组装多核苷酸的活性位点的酶。聚合酶可以结合引发的单链靶多核苷酸,并且可以将核苷酸依序添加到生长引物以形成具有与靶多核苷酸的序列互补的序列的“互补复制(complementary copy)”多核苷酸。DNA聚合酶可以结合到靶多核苷酸,然后沿靶多核苷酸向下移动,将核苷酸依序添加到生长多核苷酸链的3’端处的游离羟基基团。DNA聚合酶可从DNA模板合成互补DNA分子。RNA聚合酶可从DNA模板合成RNA分子(转录)。其他RNA聚合酶,诸如逆转录酶,可从RNA模板合成cDNA分子。还有其他RNA聚合酶可从RNA模板合成RNA分子,诸如RdRP。聚合酶可以使用短RNA或DNA链(引物)来开始链生长。一些聚合酶可以使它们将碱基添加到链的位点上游的链移位。此类聚合酶可以称为链移位的,意味着它们具有从由聚合酶读取的模板链中去除互补链的活性。

[0072] 示例DNA聚合酶包括Bst DNA聚合酶、9°Nm DNA聚合酶、Phi29DNA聚合酶、DNA聚合酶I(大肠杆菌(E.coli))、DNA聚合酶I(大)、(克列诺)片段、克列诺片段(3’-5’外-)、T4 DNA聚合酶、T7DNA聚合酶、Deep VentR™(外-)DNA聚合酶、Deep VentR™DNA聚合酶、DyNAzyme™EXT DNA、DyNAzyme™II热启动DNA聚合酶、Phusion™高保真DNA聚合酶、Therminator™DNA聚合酶、Therminator™IIDNA聚合酶、VentR®DNA聚合酶、VentR®(外-)DNA聚合酶、RepliPHI™Phi29 DNA聚合酶、rBst DNA聚合酶、rBst DNA聚合酶(大)、片段(IsoTherm™DNA聚合酶)、MasterAmp™AmpliTherm™DNA聚合酶、Taq DNA聚合酶、Tth DNA聚合酶、Tfl DNA聚合酶、Tgo DNA聚合酶、SP6 DNA聚合酶、Tbr DNA聚合酶、DNA聚合酶β、ThermoPhi DNA聚合酶和Isopol™SD+聚合酶。在具体的非限制性示例中,聚合酶选自Bst、Bsu和Phi29。一些聚合酶具有使它们后面的链降解的活性(3’核酸外切酶活性)。一些有用的聚合酶已经通过突变或以其他方式修饰以减少或消除3’和/或5’核酸外切酶活性。

[0073] 示例RNA聚合酶包括RdRp(RNA依赖性RNA聚合酶),其催化与给定RNA模板互补的RNA链的合成。RdRp的示例包括脊髓灰质炎病毒3Dpol、水泡性口炎病毒L和丙肝病毒NS5B蛋白。示例RNA逆转录酶。非限制性示例列表包括衍生自禽骨髓瘤病毒(AMV),鼠莫洛尼白血病病毒(MMLV)和/或人免疫缺陷病毒(HIV),端粒酶逆转录酶诸如(hTERT)、SuperScript™III、SuperScript™IV逆转录酶、ProtoScript® II逆转录酶的逆转录酶。

[0074] 如本文所用,术语“引物”定义为可通过游离3’OH基团向其添加核苷酸的多核苷

酸。引物可包括3'嵌段,该嵌段抑制聚合直到去除该嵌段为止。引物可包括在5'末端处的修饰以允许偶联反应或使该引物偶联到另一部分。引物可包括一个或多个部分,诸如8-oxo-G,该一个或多个部分可在合适的条件(诸如UV光、化学、酶等)下裂解。引物长度可以是任何适合数目个碱基的长度,并且可以包含天然和非天然核苷酸的任何适合组合。靶多核苷酸可包含"扩增衔接子(amplification adapter)"或更简单地说"衔接子(adapter)",该衔接子与引物杂交(具有与引物互补的序列),并且可以扩增以便通过将核苷酸添加到引物的游离3'OH基团来产生互补复制多核苷酸。

[0075] 如本文所用,术语"多个(plurality)"旨在表示两个或更多个不同成员的群体。多个数目可在小、中、大到极大的大小范围内。小的多个数目的大小可在例如几个成员到数十个成员的范围内。中等大小的多个数目可在例如数十个成员到约100个成员或数百个成员的范围内。大的多个数目可在例如约数百个成员到约1000个成员、到数千个成员、和多达数万个成员的范围内。极大的多个数目可在例如数万成员到约几十万、一百万、几百万、几千万、和多达或超过数亿成员的范围内。因此,多个数目可以在两个到远超过一亿成员的大小以及如通过成员的数目所测量的所有大小范围内、在以上示例性范围之间、且超过以上示例性范围。因此,术语的定义打算包含大于二的所有整数值。

[0076] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语"双链"旨在表示多核苷酸中的所有核苷酸或基本上所有核苷酸都与互补多核苷酸中的相应核苷酸氢键合。双链多核苷酸也可被称为"双链体"。

[0077] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语"单链"是指多核苷酸中的核苷酸基本上都没有与互补多核苷酸中的相应核苷酸氢键合。

[0078] 如本文所用,术语"靶多核苷酸"旨在表示作为分析或动作的目的的多核苷酸,并且还可称为使用术语诸如"文库多核苷酸"、"模板多核苷酸"或"文库模板"。分析或作用包含使多核苷酸经历扩增、测序、和/或其它程序。靶多核苷酸可以包含待分析的靶序列之外的核苷酸序列。例如,靶多核苷酸可以包含一种或多种衔接子,包含充当引物结合位点的扩增衔接子,该扩增衔接子侧接待分析的靶多核苷酸序列。在特定示例中,靶多核苷酸可具有彼此不同的序列,但是可具有彼此相同的第一衔接子和第二衔接子。可位于特定靶多核苷酸序列侧翼的两个衔接子可具有彼此相同的序列,或彼此互补的序列,或者这两个衔接子可具有不同的序列。因此,多个靶多核苷酸中的种类可包括已知序列的区域,该区域位于将通过例如测序(例如,SBS)来评估的未知序列区域的侧翼。在一些示例中,靶多核苷酸在单个端携带扩增衔接子,并且此类衔接子可位于靶多核苷酸的3'端或5'端。可在没有任何衔接子的情况下使用靶多核苷酸,在这种情况下,引物结合序列可直接源自靶多核苷酸中发现的序列。

[0079] 术语"多核苷酸"和"寡核苷酸"在本文中可互换地使用。除非另外具体地指示,否则不同术语并不意图表示大小、序列或其他性质的任何具体差异。为了描述的清楚起见,术语可用于在描述包括若干多核苷酸种类的特定方法或组合物时区分一种多核苷酸种类与另一种多核苷酸种类。

[0080] 如本文所用,术语"基底"是指用作本文所描述的组合物的支撑物的材料。示例性基底材料可包含玻璃、二氧化硅、塑料、石英、金属、金属氧化物、有机硅酸酯(例如,多面体有机倍半硅氧烷(POSS))、聚丙烯酸酯、氧化钽、互补金属氧化物半导体(CMOS)、或它们的组

合。POSS的示例可以是描述于Kehagias等人,《微电子工程改造(Microelectronic Engineering)》86(2009),第776-778页中的POSS,该文献以全文引用的方式并入。在一些示例中,本申请中使用的基底包含二氧化硅类基底,如玻璃、熔融硅石、或其他含二氧化硅材料。在一些示例中,基于二氧化硅的基底可包括硅、二氧化硅、氮化硅或硅烷。在一些示例中,本申请中使用的基底包含塑料材料或组分,如聚乙烯、聚苯乙烯、聚(氯乙烯)、聚丙烯、尼龙、聚酯、聚碳酸酯、和聚(甲基丙烯酸甲酯)。示例性塑料材料包含聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚苯乙烯、和环烯烃聚合物基底。在一些示例中,基底为或包含二氧化硅类材料或塑料材料或它们的组合。在特定示例中,基底具有包括玻璃或硅基聚合物的至少一个表面。在一些示例中,基底可包括金属。在一些此类示例中,金属为金。在一些示例中,基底具有包括金属氧化物的至少一个表面。在一个示例中,表面包括氧化钽或氧化锡。丙烯酰胺、烯酮、或丙烯酸酯也可用作基底材料或组分。其他基底材料可包括但不限于砷化镓、磷化铟、铝、陶瓷、聚酰亚胺、石英、树脂、聚合物和共聚物。在一些示例中,基底和/或基底表面可以是或包括石英。在一些其他示例中,基底和/或基底表面可以是或包括半导体,诸如GaAs或ITO。前述列表旨在说明但不限于本申请。基底可包括单一材料或多种不同材料。基底可以是复合材料或层压物。在一些示例中,基底包括有机硅酸盐材料。

[0081] 基底可以是平坦的、圆形的、球形的、杆状的或任何其他合适的形状。基底可以是刚性的或柔性的。在一些示例中,基底为珠粒或流通池。

[0082] 基底可以在基底的一个或多个表面上被非图案化,纹理化或图案化。在一些示例中,基底被图案化。此类图案可包括柱、垫、孔、脊、通道或其他三维凹形或凸形结构。图案在整个基底表面上可以是规则的或不规则的。例如,可以通过纳米压印光刻或通过使用例如在非金属表面上形成特征的金属垫来形成图案。

[0083] 在一些示例中,本文所述的底物形成流通池的至少一部分,或位于流通池中,或偶联到流通池。流通池可包含划分成多个泳道或多个分区的流动腔室。可用于本文阐述的方法和组合物中的示例性流通池和用于制造流通池的基底包括但不限于可从Illumina,Inc.,San Diego,CA商购获得的那些。

[0084] 如本文所用,术语“电极”旨在表示导电的固体结构。电极可包括任何合适的导电材料,诸如金、钯、银或铂或它们的组合。在一些示例中,电极可布置在基底上。在一些示例中,电极可限定基底。

[0085] 如本文所用,术语“纳米孔”旨在表示包括允许分子从纳米孔的第一侧穿过至纳米孔的第二侧的孔口的结构,其中纳米孔的孔口的一部分具有100nm或更小的宽度,例如10nm或更小、或2nm或更小。孔口延伸通过纳米孔的第一侧和第二侧。可穿过纳米孔的孔口的分子可包括例如离子或水溶性分子,诸如氨基酸或核苷酸。纳米孔可布置在屏障内,或可通过基底提供。任选地,孔口的一部分可以比纳米孔的第一侧和第二侧中的一者或两者窄,在此情况下,孔口的该部分可被称为“收缩部”。另选地或除此之外,纳米孔的孔口或纳米孔的收缩部(如果存在的话)或两者可大于0.1nm、0.5nm、1nm、10nm或更大。纳米孔可包括多个收缩部,例如至少两个、或三个、或四个、或五个、或多于五个收缩部,纳米孔包括生物纳米孔、固态纳米孔、或生物和固态杂化纳米孔。

[0086] 生物纳米孔包括例如多肽纳米孔和多核苷酸纳米孔。“多肽纳米孔”旨在表示由一种或多种多肽制成的纳米孔。该一种或多种多肽可包括单体、均聚物或杂聚物。多肽纳米孔

的结构包括例如α-螺旋束纳米孔和β-桶纳米孔以及本领域公知的所有其他纳米孔。示例多肽纳米孔包括气单胞菌溶素、α-溶血素、耻垢分枝杆菌孔蛋白A、短杆菌肽A、麦芽糖孔蛋白、OmpF、OmpC、PhoE、Tsx、F-性纤毛、SP1、线粒体孔蛋白(VDAC)、Tom40、外膜磷脂酶A、CsgG和奈瑟氏球菌自转运蛋白脂蛋白(NaIP)。耻垢分枝杆菌孔蛋白A(MspA)是由分枝杆菌产生的膜孔蛋白,从而允许亲水性分子进入细菌。MspA形成紧密互连的八聚体和跨膜β-桶,其类似于高脚杯并包含收缩部。关于α-溶血素的进一步细节,参见U.S.6,015,714,该文献的全部内容以引用方式并入本文。关于SP1的进一步细节,参见Wang等人,Chem.Commun.,49:1741-1743(2013),该文献的全部内容以引用方式并入本文。关于MspA的进一步细节,参见Butler等人,“Single-molecule DNA detection with engineered MspA protein nanopore”,Proc.Inc.Natl.Acad.Sci.105:20647-20652(2008)和Derrington等人,“Nanopore DNA sequencing with MspA”,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,107:16060-16065(2010),这两个文献的全部内容以引用方式并入本文。其他纳米孔包括,例如来自皮疽诺卡氏菌(Norcadia farcinica)的MspA同系物,以及裂解蛋白。关于裂解素的进一步细节,参见PCT公开号WO 2013/153359,该文献的全部内容以引用方式并入本文。

[0087] “多核苷酸纳米孔”旨在表示由一种或多种核酸聚合物制成的纳米孔。多核苷酸纳米孔可包括例如多核苷酸折纸。

[0088] “固态纳米孔”旨在表示由非生物来源的一种或多种材料制成的纳米孔。固态纳米孔可由无机或有机材料制成。固态纳米孔包括例如氮化硅(SiN)、二氧化硅(SiO_2)、碳化硅(SiC)、氧化铪(HfO_2)、二硫化钼(MoS_2)、六方氮化硼(h-BN)或石墨烯。固态纳米孔可包括在固态膜(例如,包括任何此类材料的膜)内形成的孔口。

[0089] “生物和固态杂化纳米孔”旨在表示由生物和非生物来源的材料制成的杂化纳米孔。生物来源的材料如上文所定义并且包括例如多肽和多核苷酸。生物和固态杂化纳米孔包括例如多肽-固态杂化纳米孔和多核苷酸-固态纳米孔。

[0090] 如本文所用,“屏障”旨在表示通常抑制分子从屏障的一侧通过至屏障的另一侧的结构。通过被抑制的分子可包括例如离子或水溶性分子,诸如核苷酸和氨基酸。然而,如果纳米孔布置在屏障内,则纳米孔的孔口可允许分子从屏障的一侧通过至屏障的另一侧。作为一个具体示例,如果纳米孔布置在屏障内,则纳米孔的孔口可允许分子从屏障的一侧通过至屏障的另一侧。屏障包括生物来源的膜,诸如脂质双层,和非生物屏障,诸如固态膜或基底。

[0091] 如本文所用,“生物来源”是指衍生自或分离自生物环境(诸如生物体或细胞)的材料,或生物可用结构的合成制造形式。

[0092] 如本文所用,“固态”是指非生物来源的材料。

[0093] 如本文所用,“合成”是指非生物来源的膜材料(例如,聚合材料、合成磷脂、固态膜或它们的组合)。

[0094] 如本文所用,“溶液”旨在指包含两种或更多种物质的均匀混合物。在这种混合物中,溶质是溶解在另一种称为溶剂的物质中的物质。溶液可包括单一溶质,或者可包括多种溶质。“水溶液”是指其中溶剂是或包括水的溶液。

[0095] 如本文所用,“聚合物膜”是指主要由非生物来源的聚合物组成的合成屏障。在一些示例中,聚合物膜基本上由非生物来源的聚合物组成。嵌段共聚物是非生物来源并且可

被包含在本发明的屏障中的聚合物的一个示例。具有离子端基的疏水性聚合物是非生物来源并且可被包含在本发明的屏障中的聚合物的另一个示例。因为本发明的屏障涉及非生物来源的聚合物,所以当提及本发明的屏障时,术语“聚合物膜”、“膜”和“屏障”在本文中可互换使用,即使术语“屏障”和“膜”通常也可涵盖其他类型的材料。

[0096] 如本文所用,术语“嵌段共聚物”旨在指具有至少第一部分或“嵌段”和至少第二部分或“嵌段”的聚合物,第一部分或“嵌段”包括第一类型单体,第二部分或“嵌段”直接或间接与第一部分偶联并且包括不同的第二类型单体。第一部分可包含第一类型单体的聚合物,或者第二部分可包含第二类型单体的聚合物,或者第一部分可包含第一类型单体的聚合物并且第二部分可包含第二类型单体的聚合物。第一部分任选地可包含亲水性不同于第一类型单体的端基,或者第二部分任选地可包含亲水性不同于第二类型单体的端基,或者第一部分任选地可包含亲水性不同于第一类型单体的端基并且第二部分任选地可包含亲水性不同于第二类型单体的端基。任何亲水性嵌段的端基可位于使用这种亲水性嵌段形成的屏障的外表面。取决于特定的构造,任何疏水性嵌段的端基可位于屏障的内表面或使用这种疏水性嵌段形成的屏障的外表面。

[0097] 嵌段共聚物包括但不限于二嵌段共聚物和三嵌段共聚物。

[0098] “二嵌段共聚物”旨在指包含彼此直接或间接偶联的第一和第二嵌段或基本上由其组成的嵌段共聚物。第一嵌段可以是亲水性的并且第二嵌段可以是疏水性的,在这种情况下,二嵌段共聚物可被称为“AB”共聚物,其中“A”是指亲水性嵌段并且“B”是指疏水性嵌段。

[0099] “三嵌段共聚物”旨在指包含彼此直接或间接偶联的第一、第二和第三嵌段或基本上由其组成的嵌段共聚物。第一嵌段和第三嵌段可包含彼此相同类型的单体(重复单元)或者可基本上由其组成,并且第二嵌段可包含不同类型的单体(重复单元)。在一些示例中,第一嵌段可以是疏水性的,第二嵌段可以是亲水性的,并且第三嵌段可以是疏水性的并且包含与第一嵌段相同类型的单体,在这种情况下,三嵌段共聚物可被称为“BAB”共聚物,其中“A”是指亲水性嵌段并且“B”是指疏水性嵌段。在其他示例中,第一嵌段可以是亲水性的,第二嵌段可以是疏水性的,并且第三嵌段可以是亲水性的并且包含与第一嵌段相同类型的单体,在这种情况下,三嵌段共聚物可被称为“ABA”共聚物,其中“A”是指亲水性嵌段并且“B”是指疏水性嵌段。

[0100] 聚合物链(例如,嵌段共聚物)的分子在聚合物膜内的特定排列可尤其取决于相应的嵌段长度、用于不同嵌段的单体的类型、嵌段的相对亲水性和疏水性、在其中形成膜的流体的组成和/或膜内聚合物链的密度。在膜的形成过程中,这些和其他因素在聚合物链的分子之间产生力,这些力以基本上最小化膜的自由能的方式横向定位和重新取向分子。一旦聚合物链已经完成这些重排,则膜可被认为是基本上“稳定的”,即使分子可在膜内保持一定的运动流动性。

[0101] 如本文所用,术语“疏水性”旨在表示倾向于排斥水分子。疏水性是一个相对概念,涉及分子相对于它们的环境的极性差异。极性环境中的非极性(疏水性)分子将倾向于以将与极性(亲水性)分子的接触减少到最小以降低系统整体的自由能的方式彼此缔合。

[0102] 如本文所用,术语“亲水性”旨在表示倾向于结合水分子。极性环境中的极性(亲水性)分子将倾向于以将与非极性(疏水性)分子的接触减少到最小以降低系统整体的自由能

的方式彼此缔合。

[0103] 如本文所用,术语“两亲性的”旨在表示同时具有亲水性和疏水性。例如,包含疏水性嵌段和亲水性嵌段的嵌段共聚物可被认为是“两亲性的”。例示性地,AB共聚物、ABA共聚物和BAB共聚物均可被认为是两亲性的。

[0104] 如本文所用,术语“接头”旨在表示部分、一个或多个分子,一个元素通过该分子附接到另一个元素。接头可以是共价的,或可以是非共价的。共价接头的非限制性示例包括部分诸如烷基链、聚醚、酰胺、酯、芳基基团、聚芳基等。非共价接头的非限制性示例包括主-客体复合、环糊精/降冰片烯、金刚烷与β-CD的包合复合、DNA杂交相互作用、链霉抗生物素蛋白/生物素等。

[0105] 如本文所用,术语“PEO”、“PEG”、“聚(氧乙烯)”和“聚(乙二醇)”旨在可互换使用,并且是指包含-$[CH_2-CH_2-O]_n$-的聚合物。在一些示例中,n为约2至约100。

[0106] 如本文所用,术语“屏障支撑物”旨在指可悬挂屏障的结构。屏障支撑物可限定孔口,使得屏障的第一部分跨该孔口悬挂,并且该屏障的第二部分设置在该屏障上并且由该屏障支撑。屏障支撑物可包括任何合适的元件排列,以限定孔口并跨该孔口悬挂屏障。在一些示例中,屏障支撑物可包括具有穿过其限定的孔口的基底,屏障可跨该孔口悬挂。附加地或另选地,屏障支撑物可包括相对于一个或多个第二特征(诸如孔的底表面)凸起的一个或多个第一特征(诸如基底内的孔的一个或多个边缘或凸缘),其中(a)一个或多个第一特征和(b)一个或多个第二特征之间的高度差限定孔口,可跨该孔口悬挂屏障。孔口可具有任何合适的形状,诸如圆形、椭圆形、多边形或不规则形状。屏障支撑物可包含任何合适的材料或材料组合。例如,屏障支撑物可以是生物来源的,或者可以是固态的。一些示例中,屏障支撑物可包含有机材料,或者可基本上由有机材料组成,有机材料例如,可固化树脂诸如SU-8;聚四氟乙烯(PTFE)、聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚对二甲苯等。附加地或另选地,在各种示例中,屏障支撑物可包含无机材料,或者可基本上由无机材料组成,无机材料例如氮化硅、氧化硅或二硫化钼。

[0107] 如本文所用,术语“环形物”旨在指附着到屏障支撑物上、位于屏障内并且部分地延伸到由该屏障支撑物限定的孔口中的液体。因此,应当理解,环形物可沿循屏障的孔口的形状,例如,可具有圆形、椭圆形、多边形或不规则形状的形状。

[0108] 包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的纳米孔装置以及制造该纳米孔装置的方法

[0109] 将参考图1、图2A至图2C、图3A至图3C、图4、图5、图6、图7、图8、图14A至图14B、图15、图16和图17描述包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的一些示例性装置及其制造方法。

[0110] 图1示意性地示出了包括使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障的示例性纳米孔组合物和装置100的剖视图。装置100包括流体孔100',该流体孔包括具有第一(反)侧111和第二(顺)侧112的屏障101、在流体孔100'内并与该屏障的第一侧111接触的第一流体120,以及在该流体孔内并与该屏障的第二侧112接触的第二流体120'。屏障101可具有通常抑制分子从屏障的一侧通过至屏障的另一侧的任何合适的结构,例如,通常抑制流体120和流体120'之间的接触。例如,如图1所示,屏障101任选地可包括第一层107和第二层108,其中的一者或两者抑制分子流过该层。例示性地,屏障101可包括双层,该双层包括分别可使用本文提

供的AB二嵌段共聚物或本文提供的BAB三嵌段共聚物或本文提供的某些ABA三嵌段共聚物形成的层107和108,并且可具有例如以下参考图2A至图2C、图14A至图14B、图15或图16更详细描述的结构。另选地,屏障101可仅包括单层,其抑制分子流过该层。例示性地,屏障101可包括可使用本文提供的某些ABA三嵌段共聚物形成的单层,并且可具有例如以下参考图2A和图15更详细描述的结构。在其他示例中,屏障101可为使用本文提供的某些ABA三嵌段共聚物形成的部分单层和部分双层,并且可具有例如以下参考图2A和图15更详细描述的结构。

[0111] 第一流体120可具有包含第一浓度的盐160的第一组合物,为了简单起见,该盐可表示为正离子,但应当理解,也可存在抗衡离子。第二流体120'可具有包含第二浓度的盐160的第二组合物,第二浓度可与第一浓度相同或不同。任何合适的一种或多种盐160可用于第一流体120和第二流体120',例如范围从普通盐到离子晶体、金属络合物、离子液体或甚至水溶性有机离子。例如,盐可包括阳离子(诸如但不限于H、Li、Na、K、NH_4、Ag、Ca、Ba和/或Mg)的任何合适组合与阴离子(诸如但不限于OH、Cl、Br、I、NO_3、ClO_4、F、SO_4和/或CO_3^{2-}…)的任何合适组合。在一个非限制性示例中,盐包括氯化钾(KCl)。还应当理解,第一流体和第二流体任选地可包括其他溶质的任何合适组合。例示性地,第一流体120和第二流体120'可包括水性缓冲液(诸如N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES),可从Fisher BioReagents商购获得)。盐160的第一浓度和第二浓度之间和/或第一流体和第二流体的其他组分之间的任何差异可产生跨屏障101的渗透压191。如本文所提供的,可选择屏障101中使用的二嵌段或三嵌段共聚物,以便为屏障提供足够的稳定性,以供在期望的时间段内使用,例如在测序多核苷酸过程中使用,以诸如参考图4至图7或图17描述的方式对多核苷酸进行测序。

[0112] 仍参考图1,在本文提供的一些示例中,装置100任选地还可包括设置在屏障101内并提供将第一侧111与第二侧112流体联接的孔口113的纳米孔。因此,纳米孔110的孔口113可为流体120和/或流体120'提供流过屏障101的通道。例如,一部分盐160可通过孔口113从屏障101的第二侧112移动到屏障的第一侧111。纳米孔110可包括固态纳米孔、生物纳米孔(例如,诸如图1中所示的MspA)或生物和固态杂化纳米孔。屏障和纳米孔的非限制性示例和性质在本文别处以及在US 9,708,655中描述,其全部内容以引用方式并入本文。以诸如图1所示的方式,装置100任选地可包括与第一流体120接触的第一电极102、与第二流体120'接触的第二电极103,以及与第一和第二电极可操作地连通并且被构造成检测孔口的电特性的变化的电路180。这种变化可例如响应于任何合适的刺激。实际上,应当理解,本发明的方法、组合物和装置可用于任何合适的应用或背景中,包括用于多核苷酸测序的任何合适的方法或装置。

[0113] 在一些示例中,第一和第二流体120、120'之间的屏障101的第一层107包括二嵌段或三嵌段共聚物的第一多个分子,并且屏障101的第二层108包括该共聚物的第二多个分子。在共聚物为二嵌段共聚物(其可称为AB)的示例中,每个分子可包括与亲水性嵌段偶联的疏水性嵌段。在共聚物为三嵌段共聚物的一些示例中,每个分子可包括第一和第二疏水性嵌段以及设置在其间的亲水性嵌段(该聚合物可称为BAB)。不管共聚物是二嵌段(AB)还是三嵌段(BAB),第一多个分子的亲水性嵌段可形成屏障101的第一外表面,例如,在第一侧111上接触流体120的层107的表面。第二多个分子的亲水性嵌段可形成屏障101的第二外表面,例如,在第二侧112上接触流体120'的层108的表面。第一和第二多个分子的疏水性嵌段

可在屏障内彼此接触。

[0114] 在其他示例中,第一和第二流体120、120'之间的屏障101包括三嵌段共聚物的多个分子,该三嵌段共聚物分子包括第一和第二亲水性嵌段以及设置在其间的疏水性嵌段(该聚合物可称为ABA)。该多个分子的第一亲水性嵌段可形成屏障101的第一外表面,例如,在第一侧111上接触流体120的屏障101的表面。该多个分子的第二亲水性嵌段可形成屏障101的第二外表面,例如,在第二侧112上接触流体120'。该多个分子的疏水性嵌段可在屏障内彼此接触。在一些示例中,形成屏障101的ABA分子可存在于单层中,而不是图1所示的两个层中。在其他示例中,形成屏障101的ABA分子可存在于类似于图1所示的双层中,因为该分子的B嵌段的分子被折叠使得给定分子的两个A嵌段彼此接触相同的流体。在其他示例中,屏障101的一部分可为单层(因为该部分的ABA分子从一种流体延伸到另一种流体),而屏障101的不同部分可为双层(因为该部分的ABA分子被折叠,使得该部分的A嵌段彼此接触相同的流体);图2A示出了这种示例。

[0115] 例如,图2A至图2C示意性地示出了使用二嵌段或三嵌段共聚物的屏障,这些共聚物可被包含在图1的纳米孔组合物和装置中。应当理解,这种屏障可适当地适用于任何其他组合物或装置,并且不限于与纳米孔一起使用。

[0116] 现在参见图2A,屏障221使用三嵌段"ABA"共聚物。屏障221包括可接触流体120和120'两者的层229。层229包含三嵌段ABA共聚物的多个分子222。如图2A所示,三嵌段共聚物的每个分子222包括第一和第二亲水性嵌段,每个亲水性嵌段表示为"A"并且长度大约为"A",以及设置在第一和第二亲水性嵌段之间的疏水性嵌段,该疏水性嵌段表示为"B"并且长度大约为"B"。分子222(形成层229的分子)的第一末端处的亲水性A嵌段形成屏障221的第一外表面,例如接触流体120。在分子222的第二末端处的亲水性A嵌段形成屏障221的第二外表面,例如接触流体120'。分子222的疏水性B嵌段以诸如图2C所示的方式位于屏障211内。如图所示,层229内的大部分分子222可基本上线性地并且以彼此相同的取向延伸。任选地,如图2A所示,分子222'中的一些分子可在其B嵌段处折叠,使得此类分子的两个亲水性A嵌段可彼此接触相同流体。因此,图2A所示的示例可被认为是部分单层和部分双层。在其他示例(未具体示出)中,层229可为完全单层或可为完全双层,例如,也如参考图1描述的。不管膜是否包含基本上线性延伸的分子222和/或折叠的分子222',如图2A所示,层229可具有大约2A+B的厚度。在一些示例中,长度A为约1RU至约100RU,例如,约2RU至约100RU、或约10RU至约80RU、或约20RU至约50RU、或约50RU至约80RU。附加地或另选地,在一些示例中,长度B为约2RU至约100RU,或约5RU至约100RU,例如,约10RU至约80RU,或约20RU至约50RU,或约50RU至约80RU。应当理解,与亲水性或疏水性嵌段偶联的任何端基都有助于屏障的总厚度。任选地,参考图2A描述的屏障221可以诸如参考图15描述的方式跨孔口悬挂。

[0117] 现在参见图2B,屏障201使用二嵌段"AB"共聚物。屏障201包括可接触流体120的第一层207和可接触流体120'的第二层208,接触方式类似于层107和108参考图1所述的方式。第一层207包含二嵌段AB共聚物的第一多个分子202,并且第二层208包含二嵌段AB共聚物的第二多个分子202。如图2B所示,二嵌段共聚物的每个分子202包括疏水性嵌段(表示为"B"且大约具有长度"B"),其偶联到亲水性嵌段(表示为"A"且大约具有长度"A")。第一多个分子202(形成层207的分子)的亲水性A嵌段形成屏障201的第一外表面,例如接触流体120。第二多个分子202(形成层208的分子)的亲水性A嵌段形成屏障202的第二外表面,例如接触

流体120'。第一和第二多个分子的疏水性B嵌段的相应末端在屏障201内以诸如图2B所示的方式彼此接触。如图所示,层207内的基本上所有分子202可基本上线性地并且以彼此相同的取向延伸,并且类似地,层208内的基本上所有分子202可基本上线性地并且以彼此相同的取向(其与层207内的分子的取向相反)延伸。因此,第一层207和第二层208各自可具有大约A+B的厚度,并且屏障201可具有大约2A+2B的厚度。在一些示例中,长度A为约2个重复单元(RU)至约100RU,或约1个重复单元(RU)至约50RU,例如,约5RU至约40RU、或约10RU至约30RU、或约10RU至约20RU、或约20RU至约40RU。附加地或另选地,在一些示例中,长度B为约2RU至约100RU、5RU至约100RU,例如,约10RU至约80RU,或约20RU至约50RU,或约50RU至约80RU。任选地,参考图2B描述的屏障201可以诸如参考图14A至图14B描述的方式跨孔口悬挂。

[0118] 现在参见图2C,屏障211使用三嵌段"BAB"共聚物。屏障211包括可接触流体120的第一层217和可接触流体120'的第二层218,接触方式类似于层107和108参考图1所述的方式。第一层217包含三嵌段共聚物的第一多个分子212,并且第二层218包含三嵌段共聚物的第二多个分子212。如图2C所示,三嵌段共聚物的每个分子212包括第一和第二疏水性嵌段,每个疏水性嵌段表示为"B"并且长度大约为"B",以及设置在第一和第二疏水性嵌段之间的亲水性嵌段,该亲水性嵌段表示为"A"并且长度大约为"A"。第一多个分子212(形成层217的分子)的亲水性A嵌段形成屏障211的第一外表面,例如接触流体120。第二多个分子212(形成层218的分子)的亲水性A嵌段形成屏障211的第二外表面,例如接触流体120'。第一和第二多个分子的疏水性B嵌段的相应末端在屏障211内以诸如图2C所示的方式彼此接触。如图所示,层217内基本上所有的分子212可以彼此相同的取向延伸,并且可在A嵌段处折叠,使得A嵌段可接触流体,而B嵌段在屏障211内部。类似地,层218内的基本上所有分子212可以彼此相同的取向(其与层217内的分子的取向相反)延伸,并且可在它们的A嵌段处折叠,使得A嵌段接触流体,而B嵌段在屏障211内部。因此,第一层217和第二层218各自可具有大约A/2+B的厚度,并且屏障211可具有大约A+2B的厚度。在一些示例中,长度A为约2RU至约100RU,例如,约10RU至约80RU,或约20RU至约50RU,或约50RU至约80RU。附加地或另选地,在一些示例中,长度B为约2RU至约100RU,或约5RU至约100RU,例如,约10RU至约80RU,或约20RU至约50RU,或约50RU至约80RU。任选地,参考图2C描述的屏障211可以诸如参考图16描述的方式跨孔口悬挂。

[0119] 应当理解,本文提供的各种屏障的层可被构造成具有任何合适的尺寸。例示性地,为了形成彼此类似尺寸的屏障:

[0120] A-B-A三嵌段共聚物(图2A)可具有2个各自长度为A的亲水性嵌段(每个A嵌段的M_w=x)和1个长度为B的疏水性嵌段(M_w=y);当自组装时,那些A-B-A三嵌段共聚物将形成具有长度为A的顶部亲水层、长度为B的核心疏水层和长度为A的底部亲水层的膜。

[0121] A-B二嵌段共聚物(图2B)可具有1个长度为A的亲水性嵌段(M_w=x)和1个长度为B的疏水性嵌段(M_w=y/2);当自组装时,那些A-B二嵌段共聚物将形成具有长度为A的顶部亲水层、长度为2B的核心疏水层和长度为A的底部亲水层的膜。

[0122] B-A-B三嵌段共聚物(图2C)可具有1个长度为A的亲水性嵌段(M_w=x)和2个各自长度为B的疏水性嵌段(每个B嵌段的M_w=y/2);当自组装时,那些B-A-B三嵌段共聚物将形成具有长度为A/2的顶部亲水层、长度为2B的核心疏水层和长度为A/2的底部亲水层的膜。

[0123] 附加地或另选地,填充到膜的层中的聚合物可影响每个屏障的亲水性比率,其中亲水性比率可定义为亲水性嵌段的分子量与嵌段共聚物(BCP)的总分子量(MW或M_w)之间的比率(亲水性比率=M_w亲水性嵌段/M_w BCP)。例如:

[0124] A-B-A三嵌段共聚物(图2A),亲水性比率=2x/(2x+y);

[0125] A-B二嵌段共聚物(图2B),亲水性比率=x/(x+y/2);和

[0126] B-A-B三嵌段共聚物(图2C),亲水性比率=x/(x+y)。

[0127] 图14A至图14B示意性地示出了图1的纳米孔组合物和装置的一个非限制性示例的进一步细节的平面图和剖视图。更具体地,在图14A至图14B所示的示例中,屏障101可使用限定孔口1430的屏障支撑物1400来悬挂。例如,屏障支撑物1400可包括具有穿过其限定的孔口1430的基底,例如基本上圆形的孔口,或具有另一形状的孔口。附加地或另选地,屏障支撑物可包括在其中形成纳米孔装置的孔的一个或多个特征,诸如在孔的任一侧上的边缘或凸缘。上文进一步提供了可包含在屏障支撑物中的材料的非限制性示例。包含疏水性(非极性)溶剂并且还可包含其他化合物的环形物1410可附着到屏障支撑物1400并且可支撑屏障101的一部分,例如可位于屏障101内(这里,在层1401与层1402之间)。另外,环形物1410可如图14A所示的方式向内逐渐变细。屏障101的分子1421的外部部分可设置在支撑物1400上(例如,在孔口1430与屏障周边1420之间延伸的部分),而分子的内部部分可形成屏障101的独立支撑部分(例如,孔口1410内的部分,其一部分由环形物1410支撑)。可制备屏障101,并可使用诸如本文其他地方所述的操作将纳米孔110插入屏障101的独立支撑部分中。尽管图14A至图14B示出了屏障101内的纳米孔110,但是应当理解,可省略纳米孔,并且屏障101可用于任何合适的目的。更一般地,应当理解,虽然本文描述的屏障特别适合与纳米孔一起使用(例如,用于纳米孔测序,诸如参考图4至图7和图17描述的),但是本发明的屏障不必具有插入其中的纳米孔。

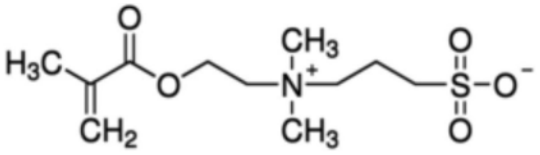
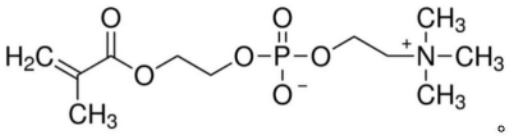
[0128] 在图14A所示的非限制性示例中,屏障101可包括第一层1401和第二层1402,该第一层包含第一多个两亲分子1421,该第二层包括与该第一多个两亲分子接触的第二多个两亲分子。在图14A所示的非限制性示例中,共聚物是二嵌段共聚物(AB),诸如参考图2B所述。这里,每个分子1421包括疏水性“B”嵌段1431(其中具有较深填充的圆圈1441表示疏水性单体)和直接或间接与其偶联的亲水性“A”嵌段1432(其中具有较浅填充的圆圈1442表示亲水性单体)。在例如将参考图15和图16描述的其他示例中,共聚物相反可包括三嵌段共聚物(例如,分别为ABA或BAB)。在图14A所示的示例中,第一多个分子1421的亲水性嵌段1432可形成屏障101的第一外表面,例如,在第一侧111上接触流体120的屏障101的表面。第二多个分子1421的亲水性嵌段1432可形成屏障101的第二外表面,例如,在第二侧112上接触流体120'的屏障101的表面。第一和第二多个分子1421的疏水性嵌段1431可在屏障内彼此接触。

[0129] 尽管图14A至图14B示出了包括二嵌段共聚物的悬挂屏障,但是应当理解,包括本文提供的其他类型的聚合物的悬挂屏障是类似地设想的。图15示意性地示出了可在参考图14A至图14B描述的示例中使用的另选屏障。图15示出了屏障1501,该屏障诸如参考图14A至图14B描述的方式使用屏障支撑物1400和环形物1410来悬挂。在该示例中,屏障1501包括ABA三嵌段共聚物的分子,诸如参考图2A所述。这里,三嵌段共聚物包括与亲水性“A”部分1542偶联并位于其之间的疏水性“B”部分1541。在图15所示的示例中,每个单独的ABA分子可处于两种排列中的一种。例如,ABA分子1521可以线性方式延伸穿过该层,其中“A”部分在

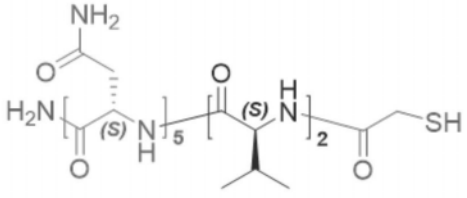
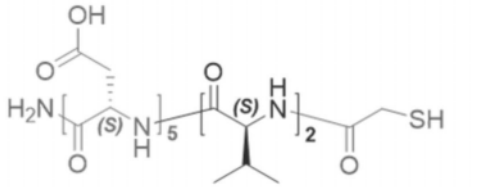
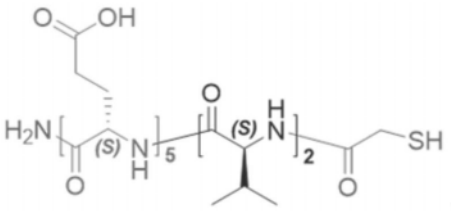
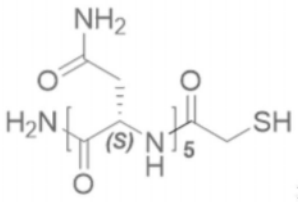
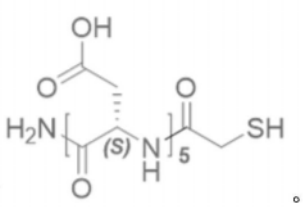
屏障的每一侧上,而“B”部分在屏障的中间。或者,例如,ABA分子1522可延伸到屏障的中间然后折叠回到其自身上,使得两个“A”部分都在屏障的同一侧上,而“B”部分在屏障的中间。因此,在该示例中,屏障1501可被认为是部分单层和部分双层。在其中屏障1501基本上包括以线性方式延伸穿过该屏障的分子1521的其他示例(未具体示出)中,屏障1501可基本上为单层。在其中屏障1501基本上包括延伸到该屏障的大约中间然后折叠回到其自身上的分子1522的其他示例(未具体示出)中,屏障1501可基本上为双层。未具体示出的纳米孔任选地可以类似于本文别处所述的方式(例如,如图14A至图14B中所示)插入到用于屏障1501的这些选项中的任一个选项中。

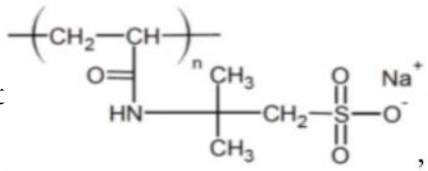
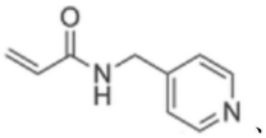
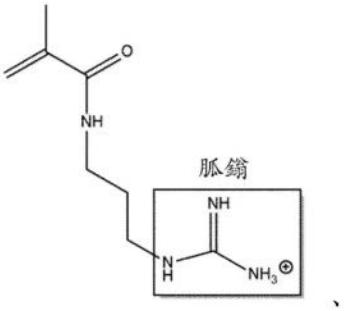
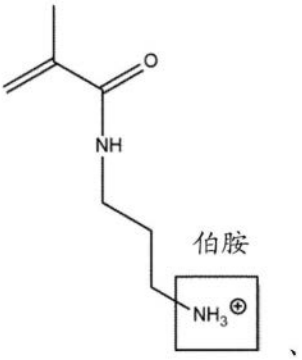
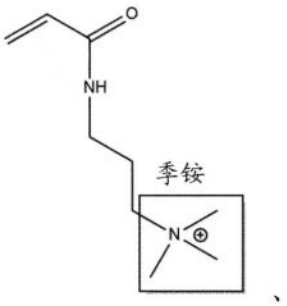
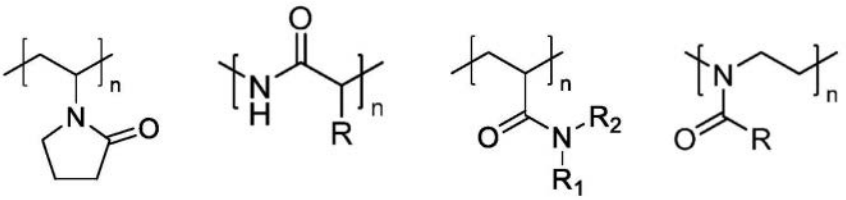
[0130] 图16示意性地示出了可在参考图14A至图14B描述的示例中使用的另选屏障。图16示出了屏障1601,该屏障诸如参考图14A至图14B描述的方式使用屏障支撑物1400和环形物1410来悬挂。在该示例中,屏障1601包括BAB三嵌段共聚物的分子,诸如参考图2C所述。这里,三嵌段共聚物包括与疏水性“B”部分1641偶联并位于其之间的亲水性“A”部分1642。在该示例中,屏障1601可具有双层构造,其中“B”部分1641朝向彼此取向。BAB分子的疏水性末端通常可位于屏障1601的大约中间,然后这些分子向屏障的任一外表面延伸然后折叠回到其自身上。因此,“B”部分位于屏障的中间,而“A”部分在屏障的一侧或另一侧。未具体示出的纳米孔任选地可以类似于本文别处所述的方式(例如,如图14A至图14B中所示)插入到屏障1601。

[0131] 本发明的二嵌段和三嵌段共聚物可包括疏水性嵌段和亲水性嵌段的任何合适的组合。在一些示例中,亲水性A嵌段可包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、亲水性多肽、含氮单元和聚(氧乙烯)(PEO)。例示性地,聚丙烯酰胺可选自由以下项组成的组:聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)和带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。可聚合以形成两性离子聚合物的两性离子单体的非限制性示例包括:

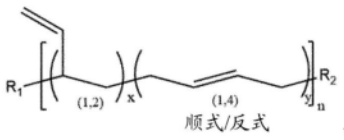
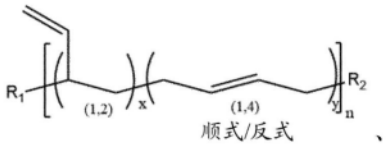
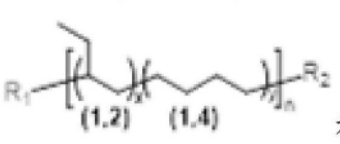
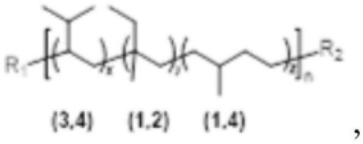
[0132]  和 。

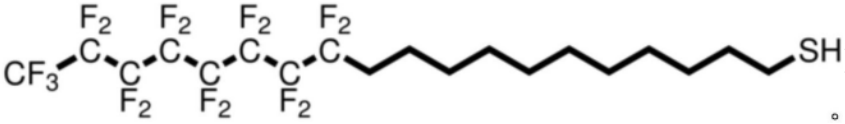
[0133] 亲水性多肽的非限制性示例包括:

[0134] 、、、 和 。

[0135] 带电荷的聚丙烯酰胺的非限制性示例是  其中n为约2至约100。含氮单元的非限制性示例包括：、、、、

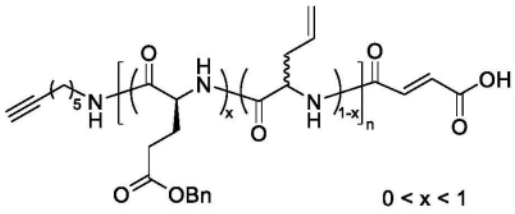
[0136] NVP、肽、AM和氧杂。

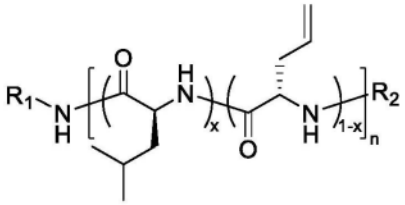
[0137] 在一些示例中，疏水性B嵌段可包括选自由以下项组成的组的聚合物：聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。氢化聚二烯的非限制性示例包括饱和聚丁二烯(PBu)、饱和聚异戊二烯(PI)、饱和聚(月桂烯)、、、和，其中n为约2至约100，x为约2至约100，y为约2至约100，z为约2至约100，R_1为选自由以下项组成的组的官能团：羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢，并且R_2为选自由以下项组成的组的反应性部分：马来酰亚胺基团、烯丙基、炔丙基、BCN基团、羧酸根基团、胺基、硫醇基、DBCO基团、叠氮基、N-羟基琥珀酰亚胺基团、生物素基团、羧基、NHS活化的酯和其他活化的酯。在氢化聚二烯的其他非限制性示例中，R_1为选自由以下项组成的组的反应性部分：马来酰亚胺基团、烯丙基、炔丙基、BCN基团、羧酸根基团、胺基、硫醇基、DBCO基团、叠氮基、N-羟基琥珀酰亚胺基团、生物素基团、羧基、NHS活化酯和其他活化的酯。氟化聚乙烯的非限制性示例为

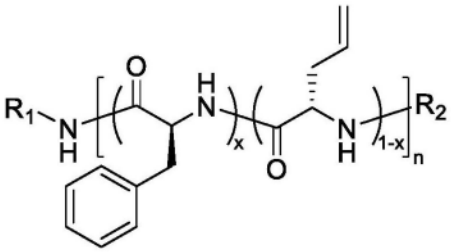
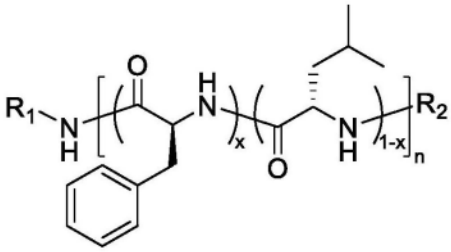


疏水性多肽的非限制性示例。

包括(0<x<1):

[0138] 

、
、

[0139] 
和
，其中n为约2至约100。

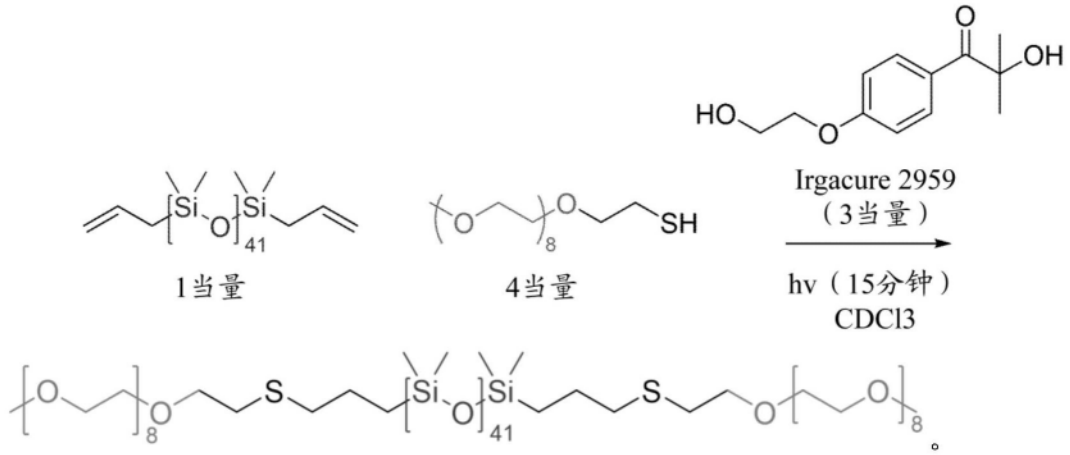
[0140] 在一个非限制性示例中,AB二嵌段共聚物包括PDMS-b-PEO,其中“-b-”表示该聚合物是嵌段共聚物。在另一个非限制性示例中,AB二嵌段共聚物包括PBd-b-PEO。在另一个非限制性示例中,AB二嵌段共聚物包括PIB-b-PEO。在另一个非限制性示例中,BAB三嵌段共聚物包括PDMS-b-PEO-b-PDMS。在另一个非限制性示例中,BAB三嵌段共聚物包括PBd-b-PEO-b-PBd。在另一个非限制性示例中,BAB三嵌段共聚物包括PIB-b-PEO-b-PIB。在另一个非限制性示例中,ABA三嵌段共聚物包括PEO-b-PBd-b-PEO。在另一个非限制性示例中,ABA三嵌段共聚物包括PEO-b-PDMS-b-PEO。在另一个非限制性示例中,ABA三嵌段共聚物包括PEO-b-PIB-b-PEO。应当理解,任何合适的亲水性嵌段可与任何合适的疏水性嵌段一起使用。另外,在包括两个亲水性嵌段的示例中,那些嵌段可以但不必包括彼此相同的聚合物。类似地,在包括两个疏水性嵌段的示例中,那些嵌段可以但不必包括彼此相同的聚合物。

[0141] 可适当地选择疏水性嵌段和亲水性嵌段的相应分子量、玻璃化转变温度和化学结构,以便为屏障提供适当的使用稳定性和插入纳米孔的能力。例如,疏水性嵌段和亲水性嵌段的相应分子量可影响每个嵌段(进而屏障的层)的厚度,并且可影响稳定性以及插入纳米孔的能力,例如通过电穿孔、移液泵循环或洗涤剂辅助的孔插入。附加地或另选地,亲水性嵌段和疏水性嵌段的分子量比率可影响那些嵌段自组装到屏障的层中。附加地或另选地,疏水性嵌段和亲水性嵌段的相应玻璃化转变温度(T_g)可影响屏障的层的侧向流动性;因此,在一些示例中,疏水性嵌段和/或亲水性嵌段的T_g小于装置的操作温度,例如小于室温,并且在一些示例中小于约0℃是有用的。附加地或另选地,疏水性嵌段和亲水性嵌段的化学结构可影响链填充到层中的方式和那些层的稳定性。

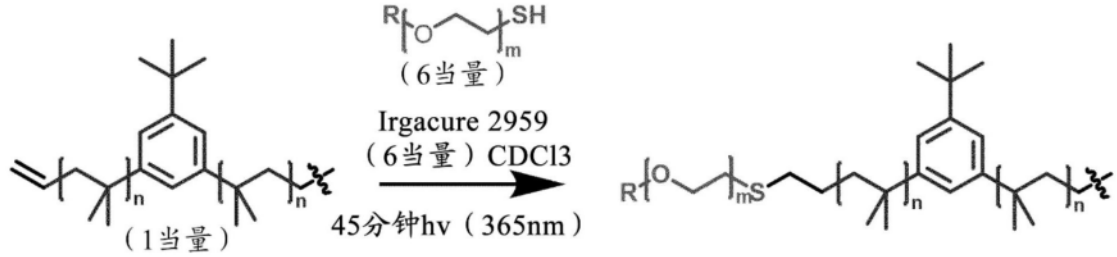
[0142] 应当理解,本发明的二嵌段和三嵌段共聚物可使用任何合适的操作组合来制备。图3A至图3C示意性地示出了用于制备三嵌段共聚物的示例性方案,该三嵌段共聚物用于图1的纳米孔组合物和装置。在一些示例中,本发明的二嵌段和三嵌段共聚物可使用诸如图3A所示的“大分子引发剂”方法制备,其中首先制备一个聚合物嵌段,然后用作引发剂(图3A中

的X)以使用单体(图3A中的[M])生长一个或多个额外的嵌段。例示性地,制备二嵌段共聚物的操作可包括聚合多种亲水性单体以形成亲水性聚合物;在亲水性聚合物的末端形成引发剂;以及使用该引发剂聚合多种疏水性单体以形成与该亲水性聚合物偶联的疏水性聚合物。另选地,制备二嵌段共聚物的操作可包括聚合多种疏水性单体以形成疏水性聚合物;在该疏水性聚合物的末端形成引发剂;以及使用该引发剂聚合多种亲水性单体以形成与该疏水性聚合物偶联的亲水性聚合物。类似地,制备三嵌段BAB共聚物的操作可包括聚合多种亲水性单体以形成亲水性聚合物;在亲水性聚合物的相应末端形成引发剂;以及使用该引发剂聚合多种疏水性单体以形成与该亲水性聚合物的每个末端偶联的疏水性聚合物。类似地,制备三嵌段ABA共聚物的操作可包括聚合多种疏水性单体以形成疏水性聚合物;在疏水性聚合物的相应末端形成引发剂;以及使用该引发剂聚合多种亲水性单体以形成与该疏水性聚合物的每个末端偶联的亲水性聚合物。在这种"大分子引发剂"方法中,引发剂(图3A中的X)可基于所使用的特定单体和所进行的聚合的特定类型适当地选择。例如,对于原子转移自由基聚合(ATRP),引发剂可包括溴或氯。或者,例如,对于可逆加成断裂链转移(RAFT)聚合,引发剂可包括链转移剂。在聚合完成之后,端基(图3A中的X)可被修饰或去除(例如,以提供图3A中的端基Y)。

[0143] 在其他示例中,本发明的二嵌段和三嵌段共聚物可使用其中聚合物嵌段分别制备的"偶联"方法制备,诸如图3B中所示,然后使用反应性部分(图3B中的X和Y)偶联在一起。例示性地,制备二嵌段共聚物的操作可包括聚合多种亲水性单体以形成亲水性聚合物;聚合多种疏水性单体以形成疏水性聚合物;以及将该亲水性聚合物与该疏水性聚合物偶联。制备三嵌段共聚物的操作可包括聚合多种亲水性单体以形成具有末端的亲水性聚合物;聚合多种疏水性单体以形成第一和第二疏水性聚合物;以及将第一和第二疏水性聚合物偶联至该亲水性聚合物的相应末端。另选地,制备三嵌段共聚物的操作可包括聚合多种亲水性单体以形成第一和第二亲水性聚合物;聚合多种疏水性单体以形成具有末端的疏水性聚合物;以及将第一和第二亲水性聚合物偶联至该疏水性聚合物的相应末端。在这种"偶联"方法中,疏水性聚合物的末端可包括第一反应性部分(图3B中的Y),并且亲水性聚合物的末端可包括第二反应性部分(图3B中的X),第二反应性部分与第一反应性部分反应以将该亲水性聚合物与该疏水性聚合物偶联。反应性部分(图3B中的X和Y)可基于被偶联的特定聚合物和所进行的偶联类型适当地选择。例如,可使用"点击"化学部分。例示性地,第一和第二反应性部分中的一者可包括叠氮化物,并且第一和第二反应性部分中的另一者可包括炔;或者第一和第二反应性部分中的一者可包括硫醇,并且第一和第二反应性部分中的另一者可包括烯烃;或者第一和第二反应性部分中的一者可包括硫醇,并且第一和第二反应性部分中的另一者包括炔。或者,例如,可形成酰胺接头。例示性地,第一和第二反应性部分中的一者可包括胺,并且第一和第二反应性部分中的另一者可包括N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。图3C示出了非限制性示例,其中疏水性聚合物为在其一个末端具有胺(NH_2)基的PDMS,亲水性聚合物为在其末端具有NHS的PEO,并且胺基和NHS基团在三异丙胺的存在下彼此反应以提供ABA三嵌段共聚物。形成三嵌段共聚物的另一个非限制性示例如下所示。在该示例中,PDMS-双烯丙基通过硫醇-烯点击化学与PEG-硫醇反应;为了进行反应,在惰性气氛下使用脱气溶剂(例如,氯仿)并且在光引发剂(例如,irgacure 2959)的存在下并且在UV暴露下进行5-30分钟。

[0144] 

[0145] 形成三嵌段共聚物的另一个非限制性示例如下所示。在该示例中，PIB-双烯丙基通过硫醇-烯点击化学与PEG-硫醇反应；为了进行该反应，在惰性气氛(干燥氩气或干燥氮气)下使用脱气溶剂(例如，氯仿)并且在存在光引发剂(例如，irgacure 2959)的情况下进行该反应，并且在UV暴露下持续5-60分钟。在一些示例中，该反应在UV暴露下进行2-180分钟，其中UV功率范围为1mW/cm^{2}至100mW/cm^2。在一些示例中，所使用的UV波长为365nm。

[0146] 

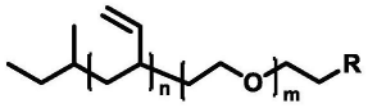
[0147] 对于纳米孔测序应用，膜流动性可被认为是有益的。不希望受任何理论的束缚，认为嵌段共聚物膜的流动性很大程度上由疏水性“B”嵌段的物理性质赋予。更具体地，包括“低T_g”疏水性聚合物(例如，具有低于约0℃的T_g)的B嵌段可用于产生比具有包括“高T_g”聚合物(例如，具有高于室温的T_g)的B嵌段的膜更具流动性的膜。例如，在某些示例中，共聚物的疏水性B嵌段具有小于约20℃、小于约0℃或小于约-20℃的T_g。

[0148] 具有低T_g的疏水性B嵌段可用于在适于进行纳米孔测序的条件下帮助维持膜柔性，例如，以诸如参考图4、图5、图6、图7或图17所述的方式。在一些示例中，用于纳米孔测序的具有足够低的T_g的疏水性B嵌段可包括PIB或可基本上由PIB组成，该PIB可预期具有约-75℃至约-25℃范围内的T_g。在其他示例中，用于纳米孔测序的具有足够低的T_g的疏水性B嵌段可包括PDMS或可基本上由PDMS组成，该PDMS可预期具有约-135℃(或更低)至约-115℃范围内的T_g。在其他示例中，用于纳米孔测序的具有足够低的T_g的疏水性B嵌段可包括PBd或可基本上由PBd组成。不同形式的PBd可用作本发明的屏障中的B嵌段。例如，可预期顺式-1,4形式的PBd具有约-105℃至约-85℃范围内的T_g。或者，例如，可预期顺式-1,2形式的PBd具有约-25℃至约0℃范围内的T_g。或者，例如，可预期反式-1,4形式的PBd具有约-95℃至约-5℃范围内的T_g。在其他示例中，用于纳米孔测序的具有足够低的T_g的疏水性B嵌段可包括或可基本上由聚月桂烯(PMyr)组成，其可预期具有在约-75℃至约-45℃范围内的T_g。在其他示例中，用于纳米孔测序的具有足够低的T_g的疏水性B嵌段可包括聚异戊二烯(PIP)或可基本上由聚异戊二烯(PIP)组成。不同形式的PIP可用作本发明的屏障中的B嵌段。例如，可预

期顺式-1,4形式的PIP具有约-85℃至约-55℃范围内的T_g。或者,例如,可预期反式-1,4形式的PIP具有约-75℃至约-45℃范围内的T_g。

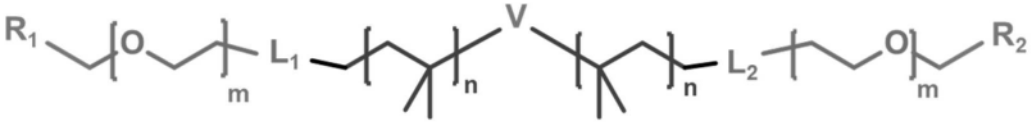
[0149] 具有完全饱和碳主链的疏水性B嵌段(诸如PIB)也可预期增加嵌段共聚物膜的化学稳定性。附加地或另选地,疏水性B嵌段内的支链结构,诸如使用PIB,可预期诱导链缠结,这可预期增强嵌段共聚物膜的稳定性。这可允许使用更小的疏水性嵌段,减少疏水错配对插入的纳米孔的不利影响。附加地或另选地,具有相对低极性的疏水性B嵌段可预期是更好的电绝缘体,从而改善用于纳米孔测序的装置的电性能(例如,诸如参考图4至图7或图17所述)。

[0150] 在以下所示的包括PBd作为B嵌段和PEO作为A嵌段的AB共聚物的一些示例中,R为选自由以下项组成的组的官能团:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢;m=约2至约100;并且n=约2至约100。

[0151] 

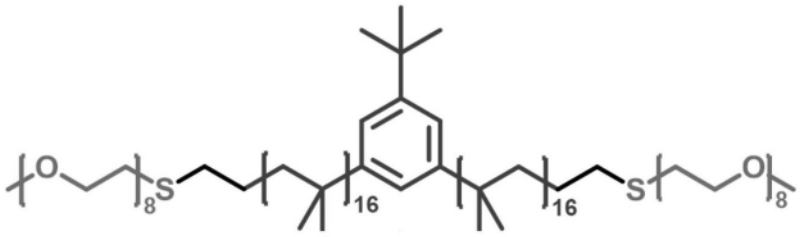
[0152] 在一些非限制性示例中,R=OH;n=约8至约50;并且m=约1至约20。在一些非限制性示例中,R=OH;n=约10至约15;并且m=约5至约15。

[0153] 在以下所示的包括一个或多个PIB嵌段作为B嵌段和PEO作为A嵌段的ABA共聚物的一些示例中,R_1和R_2独立地为选自由以下项组成的组的部分:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢;V是对应于双官能引发剂的任选基团,异丁烯可由该引发剂增长,并且可以是叔丁基苯,通过对位、间位或邻位连接至疏水性嵌段的苯基,萘,另一芳族基团,具有约2至约20个碳的烷烃链,或另一脂族基团;m=约2至约100;并且n=约2至约100。V可任选地侧接选自由以下项组成的组的官能团:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。当V不存在时,仅存在一个PIB嵌段并且n=约2至约100。L_1和L_2独立地为接头,这些接头可包括至少一个选自由以下项组成的组的部分:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

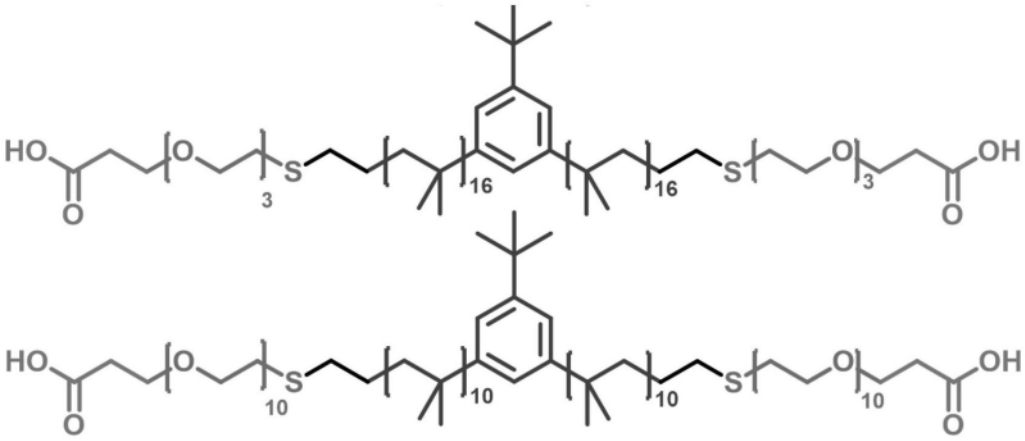
[0154] 

[0155] 在上述结构的一些非限制性示例中,n=约2至约50,并且m=约1至约50,$R_1=R_2=$COOH,V=叔丁基苯,并且$L_1=L_2=$乙基硫醚。在其他非限制性示例中,n=约5至约20,m=约2至约15,$R_1=R_2=$COOH,V=叔丁基苯,并且$L_1=L_2=$乙基硫醚。在其他非限制性示例中,n=约13至约19,m=约2至约5,$R_1=R_2=$COOH,V=叔丁基苯,并且$L_1=L_2=$乙基硫醚。在其他非限制性示例中,n=约7至约13,m=约7至约13,$R_1=R_2=$COOH,V=叔丁基苯,并且$L_1=L_2=$乙基硫醚。特别地,在一个非限制性示例中(其结构如下所示),n=16,m=3,$R_1=R_2=$COOH,V=叔丁基苯,并且$L_1=L_2=$乙基硫醚。在另一个非限制性示例中(其结构如下所示),n=10,m=10,并且$R_1=R_2=$COOH,V=叔丁基苯,并且$L_1=L_2=$乙基硫醚。在另一个非限制性示例中(其

结构如下所示),n=16,m=8,R_1=R_2=CH_3,V=叔丁基苯,并且L_1=L_2=乙基硫醚。

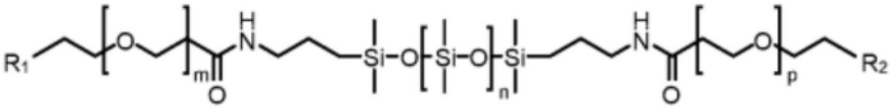


[0156]



[0157] 在一些示例中,多官能前体可来源于并用作合成双官能引发剂的前体,在上文进一步所述的示例中,V对应于这些双官能引发剂。例如,多官能前体可以是5-叔丁基间苯二甲酸(TBIPA),其可使用本领域已知的反应合成为1-(叔丁基)-3,5-双(2-甲氧基丙-2-基)苯(TBDMPB)。在另一个示例中,可使用本领域已知的反应将TBIPA合成为1-叔丁基-3,5-双(2-氯丙-2-基)苯。这种双官能引发剂的使用允许在引发剂的两侧进行阳离子聚合,产生双官能PIB诸如烯丙基-PIB-烯丙基,该双官能PIB然后可与亲水性A嵌段偶联以产生包括PIB作为B嵌段的ABA嵌段共聚物。这里,尽管双官能引发剂可位于第一和第二PIB聚合物之间,但是应当理解,第一和第二PIB聚合物和双官能引发剂(V)一起可被认为形成B嵌段,例如ABA三嵌段共聚物的B嵌段。

[0158] 在另一个非限制性示例中,ABA三嵌段共聚物包括

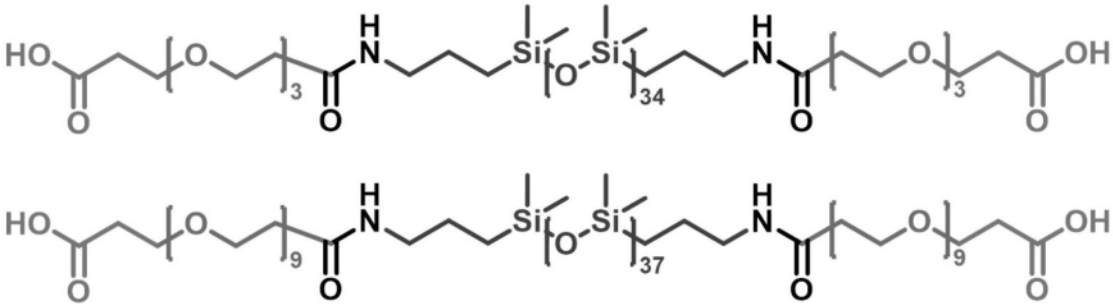


,其中m=约2至约100,n=约2至约100,p=约2至约100,R_1和R_2独立地为选自由以下项组成的组的官能团:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。在一些非限制性示例中,m=约2至约30,n=约25至约45,p=约2至约30,R_1和R_2独立地为选自由以下项组成的组的官能团:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。在一些非限制性示例中,m=约2至约15,n=约30至约40,p=约2至约15,R_1和R_2独立地为选自由以下项组成的组的官能团:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。在一些非限制性示例中,m=约7至约11,n=约35至约40,p=约7至约11,R_1和R_2独立地为选自由以

下项组成的组的官能团:羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。在一些非限制性示例中,m=约2至约5,n=约30至约37,p=约2至约5,R_1和R_2独立地为选自由以下项组成的组的官能团:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢。

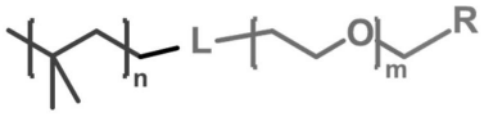
[0159] 特别地,如下所示,在一个非限制性示例中,m=3,n=34,p=3,并且$R_1=R_2$=COOH。在以下所示的另一个非限制性示例中,m=9,n=37,p=9,并且$R_1=R_2$=COOH。

[0160]

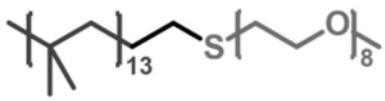


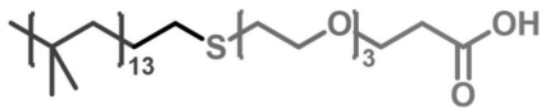
[0161] 在以下所示的包括PIB嵌段作为B嵌段和PEO作为A嵌段的AB共聚物的一些示例中,R为选自由以下项组成的组的部分:羧酸、羧基、甲基、羟基、伯胺、仲胺、叔胺、生物素、硫醇、叠氮化物、炔丙基、烯丙基、丙烯酸酯基团、两性离子基团、硫酸根、磺酸根、烷基、芳基、正交官能团和氢;m=约2至约100;n=约2至约100;并且L是选自由以下项组成的组的接头:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0162]

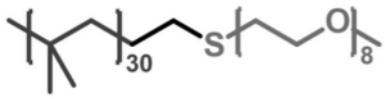


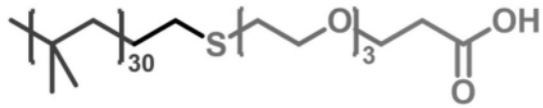
[0163] 特别地,如下所示,在一个非限制性示例中,n=13,m=8,R是甲基,并且L是乙基硫醚。在以下所示的另一个非限制性示例中,n=13,m=3,R是羧基,并且L是乙基硫醚。在以下所示的另一个非限制性示例中,n=30,m=8,R是甲基,并且L是乙基硫醚。在以下所示的另一个非限制性示例中,n=30,m=3,R是羧基,并且L是乙基硫醚。





[0164]





[0165] 应当理解,诸如参考图1描述的纳米孔装置可以使用任何合适的屏障来制造,诸如但不限于参考图2A至图2C描述的那些。另外,屏障可使用任何合适的共聚物制造,诸如但不限于参考图3A至图3C描述的那些。例如,参考图1描述的装置100可使用包括在流体孔中形成屏障以及将纳米孔插入屏障内的操作来制造。可诸如参考图14A至图14B、图15和图16描述的方式使用屏障支撑物1400来悬挂屏障。形成屏障可包括如本领域已知的“涂布”。用于涂布由屏障支撑物悬挂的屏障的已知技术包括刷涂(手动)、机械涂布(例如,使用搅拌棒)和气泡涂布(例如,使用通过装置的流动)。用于将纳米孔插入悬挂屏障中的已知技术包括电穿孔、移液泵循环和洗涤剂辅助的孔插入。使用合成聚合物形成悬挂屏障并在悬挂屏障中插入纳米孔的工具可商购获得,诸如得自美国加利福尼亚州(California,USA)的Nanion Technologies Inc.的Orbit 16TC平台。

[0166] 在一些示例中,当经受跨越屏障的450mV的电压时,屏障可具有70%或更多、80%或更多、90%或更多、或95%或更多的存活率。在一些示例中,屏障在100mV下具有95pA或更大、或100pA或更大的开孔电流。在一些示例中,屏障在50mV下具有32pA或更大、34pA或更大、或36pA或更大的开孔电流。在一些示例中,屏障孔RMS噪声为2.2pA或更小、2.0pA或更小、1.8pA或更小、1.6pA或更小、或1.5pA或更小。在一些示例中,屏障具有40或更大、50或更大、60或更大、或70或更大的信噪比。在一些示例中,屏障具有90%或更大、或95%或更大的膜涂布产率。

[0167] 在一些示例中,屏障具有约300mV至约1100mV的孔插入电压。在一些示例中,屏障在插入后具有85%或更大、90%或更大、或95%或更大的单孔百分比。在一些示例中,屏障具有90%或更大、或95%或更大的单孔存活率。在一些示例中,屏障具有2pA或更小、1pA或更小、或0.5pA或更小的单孔电流标准偏差。

[0168] 在一些示例中,波形被施加到由一系列正电压微脉冲构成的屏障,这些正电压微脉冲被-100mV的负电压周期间隔100ms。该系列正电压脉冲总共具有20个脉冲,持续时间为10μs。它们之间的间隔具有30ms的设定持续时间值和保持在+50mV的电压。在第一循环期

间,可连续地施加波形5分钟,并且脉冲的幅度保持在+700mV。在进一步施加的循环中(再次施加,每次5分钟),脉冲强度以100mV的步长从+700mV增加到+1200mV,总共六个循环。在一些示例中,在这种波形下的膜存活率为60%或更大、80%或更大、90%或更大、或95%或更大。在一些示例中,50%膜存活率下的电压为1000mV或更大,或1200mV或更大。在一些示例中,50%膜和单孔存活率下的电压为900mV或更大,或1000mV或更大。

[0169] 还应当理解,本发明的屏障可用于任何合适的装置或应用中。例如,图4示意性地示出了图1的组合物和装置的示例性用途的剖视图。图4中示出的装置100可被构造成包括流体孔100'、可具有诸如参考图2A至图2C、图14A至图14B、图15和/或图16描述的构造的屏障101(即屏障101任选地可使用屏障支撑物来悬挂,并且可包括本文提供的任何AB、ABA或BAB共聚物)、第一和第二流体120、120',以及以诸如参考图1描述的方式的纳米孔110。在图4所示的非限制性示例中,第二流体120'任选地可分别包括多个核苷酸121、122、123、124中的每一者,例如G、T、A和C。第二流体120'中的核苷酸121、122、123、124中的每一者可任选地与相应标记131、132、133、134偶联,这些标记经由细长主体(未特异性标记的细长主体)与核苷酸偶联。任选地,装置100还可包括聚合酶105。如图4所示,聚合酶105可在第二流体120'的第二组合物内。另选地,聚合酶105可与纳米孔110或屏障101偶联,例如经由合适的细长主体(未具体示出)。装置100还可任选地以诸如图4所示的方式包括第一多核苷酸140和第二多核苷酸150。聚合酶105可用于使用第二多核苷酸150的序列将多个核苷酸依次添加到第一多核苷酸140中。例如,在图4所示的特定时间,聚合酶105将核苷酸122(T)掺入第一多核苷酸140中,该第一多核苷酸与第二多核苷酸150杂交以形成双链体。在其他时间(未具体示出),聚合酶105可使用第二多核苷酸150的序列将核苷酸121、122、123、124中的其他核苷酸依次掺入第一多核苷酸140中。

[0170] 图4所示的电路180可被构造成响应于聚合酶使用第二多核苷酸150的序列将多个核苷酸依次添加到第一多核苷酸140中而检测孔口的电特性变化。在图4所示的非限制性示例中,纳米孔110可与永久性系链410偶联,该永久性系链可包括头部区域411、尾部区域412、细长主体413、报告基因区域414(例如,无碱基核苷酸)和部分415。系链410的头部区域411经由任何合适的化学键、蛋白质-蛋白质相互作用或通常不可逆的任何其他合适附接而与纳米孔110偶联。头部区域411可附接到纳米孔110的任何合适部分,这将报告基因区域414放置在孔口413内并将部分415放置在足够靠近聚合酶105的位置,以便与由聚合酶105作用的核苷酸121、122、123、124的相应标记131、132、133、134相互作用。部分415可分别与标记131、132、133、134相互作用,以此方式使得报告基因区域414在孔口113内移动,并因此改变盐160移动通过孔口113的速率,从而能够可检测地改变孔口113的导电性,以此方式使得被电路180检测。关于使用与纳米孔偶联的永久性系链对多核苷酸进行测序的进一步细节,参见US 9,708,655,该文献的全部内容以引用方式并入本文。

[0171] 图5示意性地示出了图1的组合物和装置的另一示例性用途的剖视图。如图5所示,装置100可包括流体孔100'、可具有诸如参考图2A至图2C、图14A至图14B、图15和/或图16描述的构造的屏障101(即屏障101任选地可使用屏障支撑物来悬挂,并且可包括本文提供的任何AB、ABA或BAB共聚物)、第一和第二流体120、120'、纳米孔110,以及第一和第二多核苷酸140、150,所有这些可与参考图4所述类似地构造。在图5所示的非限制性示例中,核苷酸121、122、123、124不必与相应标记偶联。聚合酶105可与纳米孔110偶联,并且可与永久性系

链510偶联,该永久性系链可包括头部区域511、尾部区域512、细长主体513和报告基因区域514(例如,无碱基核苷酸)。系链510的头部区域511经由任何合适的化学键、蛋白质-蛋白质相互作用或通常不可逆的任何其他合适附接而与聚合酶105偶联。头部区域511可附接到聚合酶105的任何合适部分,这将报告基因区域514放置在孔口113内。当聚合酶105与核苷酸121、122、123、124相互作用时,此类相互作用可能导致聚合酶105经历构象变化。此类构象变化可使报告基因区域514在孔口113内移动,并因此改变盐160移动通过孔口113的速率,从而能够可检测地改变孔口113的导电性,以此方式使得被电路180检测。关于使用与聚合酶偶联的永久性系链对多核苷酸进行测序的进一步细节,参见US 9,708,655,该文献的全部内容以引用方式并入本文。

[0172] 图6示意性地示出了图1的组合物和装置的另一示例性用途的剖视图。如图6所示,装置100可包括流体孔100'、可具有诸如参考图2A至图2C、图14A至图14B、图15和/或图16描述的构造的屏障101(即屏障101任选地可使用屏障支撑物来悬挂,并且可包括本文提供的任何AB、ABA或BAB共聚物)、第一和第二流体120、120'和纳米孔110,所有这些可与参考图4所述类似地构造。在图6所示的非限制性示例中,多核苷酸150在所施加的力(例如,电路180在电极102和电极103之间施加的偏置电压)下易位通过纳米孔110。当多核苷酸150中的碱基通过纳米孔110时,此类碱基可改变盐160移动通过孔口113的速率,从而能够可检测地改变孔口113的导电性,以此方式使得被电路180检测。关于使用纳米孔对通过其易位的多核苷酸进行测序的进一步细节,参见US 5,795,782,该文献的全部内容以引用方式并入本文。

[0173] 图7示意性地示出了图1的组合物和装置的另一示例性用途的剖视图。如图7所示,装置100可包括流体孔100'、可具有诸如参考图2A至图2C、图14A至图14B、图15和/或图16描述的构造的屏障101(即屏障101任选地可使用屏障支撑物来悬挂,并且可包括本文提供的任何AB、ABA或BAB共聚物)、第一和第二流体120、120'和纳米孔110,所有这些可与参考图4所述类似地构造。在图7所示的非限制性示例中,替代聚合物750在所施加的力(例如,电路180在电极102和电极103之间施加的偏置电压)下易位通过纳米孔110。如本文所用,"替代聚合物"旨在表示标记的细长链,其具有与多核苷酸中的核苷酸序列对应的序列。在图7所示的示例中,替代聚合物750包括经由接头752彼此偶联的标记751。XPANDOMER™是由Roche Sequencing公司(Pleasanton,CA)开发的特定类型的替代聚合物。XPANDOMERS™可使用Sequencing By eXpansion™(SBX™,Roche Sequencing,Pleasanton CA)来制备。在Sequencing by eXpansion™中,工程化的聚合酶使用靶多核苷酸的序列来聚合xNTP,其中包括经由接头与标记偶联的核碱基。然后处理所聚合的核苷酸以产生标记的细长链,该细长链通过在这些标记之间偶联的接头彼此分离,并具有与靶多核苷酸互补的序列。例如对XPANDOMERS™、接头(系链)、标记、工程化的聚合酶以及用于SBX™的方法的描述,参见以下专利,其中这些专利中的每一者的全部内容以引用方式并入本文:US 7,939,249、US 8,324,360、US 8,349,565、US 8,586,301、US 8,592,182、US 9,670,526、US 9,771,614、US 9,920,386、US10,301,345、US10,457,979、US10,676,782、US10,745,685、US10,774,105和US10,851,405。

[0174] 图17示意性地示出了图1的组合物和装置的另一示例性用途的剖视图。如图17所示,装置100可包括流体孔100'、可具有诸如参考图2A至图2C、图14A至图14B、图15和/或图16描述的构造的屏障101(即屏障101任选地可使用屏障支撑物来悬挂,并且可包括本文提

供的任何AB、ABA或BAB共聚物)、第一和第二流体120、120'和纳米孔110,所有这些可与参考图4所述类似地构造。在图17所示的非限制性示例中,多核苷酸140和多核苷酸150之间的双链体在所施加的力(例如,电路180在电极102和电极103之间施加的偏置电压)下位于纳米孔110内。双链部分中的碱基(这里,双链体末端处的碱基对GC 121、124)和多核苷酸150的单链部分中的碱基(这里,碱基A和T 123、122)的组合可改变盐160移动通过孔口113的速率,并且因此能够可检测地改变孔口113的导电性,以此方式使得被电路180检测到。关于使用纳米孔对通过其易位的多核苷酸进行测序的进一步细节,参见授予Mandell等人的美国专利公开号2023/0090867,该专利的全部内容以引用方式并入本文。

[0175] 应当理解,诸如参考图1至图7、图14A至图14B、图15、图16和图17所述的组合物和装置可以任何合适的方式制备。图8示出了用于形成如图1所示的装置的操作的流程。图8所示的方法800包括在第一流体和第二流体之间形成屏障,该屏障由限定孔口的屏障支撑物悬挂,该屏障包括跨该孔口悬挂并且包含嵌段共聚物的分子的一个或多个层(操作810)。可使用本文提供的或本领域已知的任何合适的操作组合来形成屏障。例如,形成屏障可包括如本领域已知的"涂布"。用于涂布由屏障支撑物悬挂的屏障的已知技术包括刷涂(手动)、机械涂布(例如,使用搅拌棒)和气泡涂布(例如,使用通过装置的流动)。

[0176] 该嵌段共聚物的每个分子可包括一个或多个具有大约长度A的亲水性嵌段和一个或多个具有大约长度B的疏水性嵌段。该一个或多个亲水性嵌段可形成该屏障的外表面,并且疏水性嵌段位于该屏障内。例如,屏障可包括本文提供的任何AB、ABA或BAB共聚物。在一些示例中,该一个或多个疏水性嵌段可包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。由于如本文其他地方所解释的原因,可预期此类聚合物产生具有用于纳米孔测序操作的特别有用品质的悬挂膜,例如,如参考图4至图7和图17所述。

[0177] 方法800任选地还包括将纳米孔插入到屏障中(操作820)。纳米孔可提供第一流体和第二流体之间的接触。可使用诸如本文其他地方所述或本领域已知的操作将纳米孔插入到屏障中。用于将纳米孔插入悬挂屏障中的已知技术包括电穿孔、移液泵循环和洗涤剂辅助的孔插入。使用合成聚合物形成悬挂屏障并在悬挂屏障中插入纳米孔的工具可商购获得,诸如得自美国加利福尼亚州(California,USA)的Nanion Technologies Inc.的Orbit16TC平台。应当理解,如果期望使用没有纳米孔的屏障,则操作820不必在操作810之后执行。

[0178] 例示性地,嵌段共聚物是AB二嵌段共聚物,诸如参考图2B和图14A至图14B所述。因此,屏障可具有大约2A+2B的厚度。在这种二嵌段共聚物的一个非限制性示例中,疏水性嵌段可以是聚丁二烯(PBd)。另选地,嵌段共聚物可以是具有两个亲水性嵌段和一个疏水性嵌段的ABA三嵌段共聚物。因此,屏障可具有大约2A+B的厚度。在这种三嵌段共聚物的一个非限制性示例中,疏水性嵌段是聚(异丁烯)(PIB)或PDMS。在又一另选方案中,嵌段共聚物是具有两个疏水性嵌段和一个亲水性嵌段的BAB三嵌段共聚物。因此,屏障可具有大约A+2B的厚度。

[0179] 工作实施例

[0180] 除非在权利要求书中特别说明,否则以下实施例旨在仅仅是说明性的,而非限制本发明。

[0181] 实施例1.

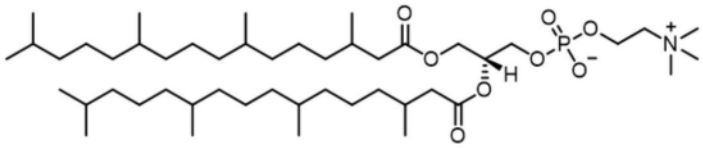
[0182] PDMS-b-PEO-b-PDMS和PBd-b-PEO的性能根据膜制备的容易程度、受控的单个对比多个纳米孔插入以及对渗透压的稳定性进行评估。

[0183] 所有材料均在来自NanION的Orbit-16仪器上进行测试。该工具允许通过旋转芯片腔顶部上的Teflon搅拌棒进行机械涂布,以及对膜/孔构建体进行电测试(膜电容测量,纳米孔I/V曲线)。

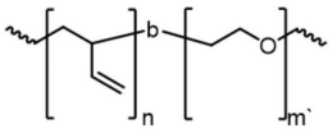
[0184] 膜涂布和纳米孔插入

[0185] 磷脂1,2-二植烷酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPhPC)(广泛用于形成脂质双层)、PEO_{500}-b-PBd_{700}("P5",商购获得自Polymer Source,Inc.(魁北克,加拿大),P41716a-BdEO)和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$("P2",商购获得自Polymer Source,Inc,P9091-DMSEODMS)分别在辛烷(5mg/mL)中稀释,然后诸如参考图14A至图14B、图15和图16所述使用包括圆形孔口的支撑物通过悬挂膜形成(也称为膜涂布)进行测试。选择这3种材料用于比较,因为它们具有相似的亲水性比率和相对低的T_g和足够低的疏水性嵌段M_w以促进孔插入。更具体地,PDMS的T_g的范围是从-130℃到-120℃。PBd的T_g为约-95℃,尽管取决于异构体其可增加至-12℃。因此,在一些示例中,低T_g可被认为是负温度。

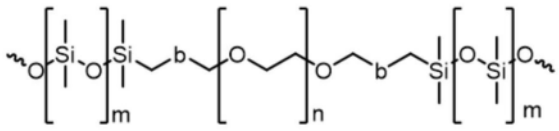
DPhPC



[0186] PBd-b-PEO



PDMS-b-PEO-PDMS



[0187] 在涂布质量方面,与DPhPC相比,AB和BAB聚合物都需要更少的材料和在腔体顶部上更少的搅拌棒旋转以形成稳定的膜。

[0188] 另外,测量使用三种不同化合物制造的膜的电容值和噪声水平。例如,图9示出了描述针对由DPhPC、PEO_{500}-b-PBd_{700}(P5)和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$(P2)形成的膜测量的电容(图910)和噪声(图920)的图和表格。从图910可以理解,DPhPC显示出最高的电容值(约2.5pF),其中PEO_{500}-b-PBd_{700}和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$显示出较低的电容:分别为约2±0.7pF和1.5。从图920可以理解,对于这三种材料,膜噪声是类似的。

[0189] 图10示出了根据针对DPhPC、PEO_{500}-b-PBd_{700}(P5)和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$(P2)膜测量的电压的剩余的膜的归一化数目的图。膜的初始数目(16)用于标准化在不同电压下剩余的膜的数目。膜的平均数±STD(n=3)。在给定电压下剩余的膜的归一化数目对应于膜对击穿电压的电阻。在该测试中,跨膜电压逐渐增加以确定膜开始破裂的电压。从图10可以理解,与DPhPC膜相比,由AB和BAB两种聚合物材料制成的膜在高得多的电压下破裂,突出了它们更高的稳定性。

[0190] 使用DPhPC与AB和BAB聚合材料形成的膜之间的另一个差异是将单个纳米孔插入该膜中有多困难。对于诸如参考图4至图7所述的纳米孔测序,在每个膜中插入单个纳米孔是有用的。然而,发现用DPhPC相对难以实现单个纳米孔插入,这导致具有单个纳米孔的膜和具有多个纳米孔的膜的混合物。另一方面,发现PEO_{500}-b-PBd_{700}和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$提供对单个纳米孔插入的显著改善的控制。

[0191] 在纳米孔性质方面,观察到当在AB或BAB聚合物膜中捕获时,MspA纳米孔具有比在DPhPC膜中稍低的电流水平。这被认为是由聚合物膜的较高电阻驱动的。例如,观察到PEO_{500}-b-PBd_{700}和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$膜中的MspA纳米孔具有比DPhPC膜中的MspA纳米孔高约25%的电阻(较低电导率)。观察到MspA纳米孔噪声水平在DPhPC和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$之间是可比较的,但当插入PEO_{500}-b-PBd_{700}膜中时略高。

[0192] 为了评估AB聚合物膜的稳定性,评估了MspA纳米孔/PEO_{500}-b-PBd_{700}膜构建体在1M KCl+50mM HEPES缓冲液中在AC下的稳定性。图11示出了在1M KCl+50mM HEPES缓冲液中MspA纳米孔/PEO_{500}-b-PBd_{700}膜构建体稳定性的图。如图11所示,该纳米孔/膜组件可在16小时内保持稳定。相比之下,观察到在类似条件下插入DPhPC膜中的MspA存活约1小时。所记录的电流随时间的增加归因于缓冲液蒸发,因为系统是开孔的。

[0193] 膜和膜/孔结构在渗透压下的稳定性

[0194] 在一些配置中,盐不平衡设置可改善纳米孔测序期间的性能,诸如参考图4和图5所述。例如,流体120'(也称为顺侧)中的较低盐浓度可帮助维持聚合酶活性,并且流体120(也称为反侧)中的较高盐浓度可帮助增加电流水平。在平衡盐条件的非限制性示例中,流体120'和120均包括150mM KCl和50mM HEPES。在非平衡盐条件的非限制性示例中,流体120'(顺)包括50mM KCl、50mM HEPES和0.1mM三(2-羧乙基)膦(TCEP);并且流体120(反)包括300mM KCl和50mM HEPES。以诸如参考图1所述的方式,这种盐浓度的不平衡可产生渗透压191。观察到PEO_{500}-b-PBd_{700}(P5)和$PDMS_{500}$-b-PEO_{420}-b-$PDMS_{500}$(P2)膜均在500mM/1000mM盐条件下存活。还观察到PEO_{500}-b-PBd_{700}(P5)在250mM/1000mM不平衡盐条件下存活。由此可知,本发明的二嵌段和三嵌段膜可在渗透压下使用。

[0195] 实施例2.

[0196] 不同共聚物的性能根据膜制备的容易程度、受控的单个对比多个纳米孔插入以及对渗透压的稳定性进行评估。

[0197] 所有材料均在来自NanION的Orbit-16仪器上进行测试。该工具允许通过旋转芯片腔顶部上的Teflon搅拌棒进行机械涂布,以及对膜/孔构建体进行电测试(膜电容测量,纳米孔I/V曲线)。

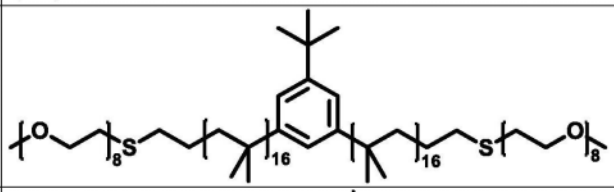
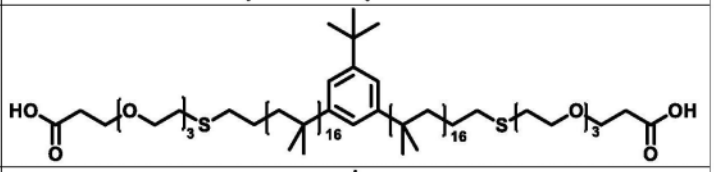
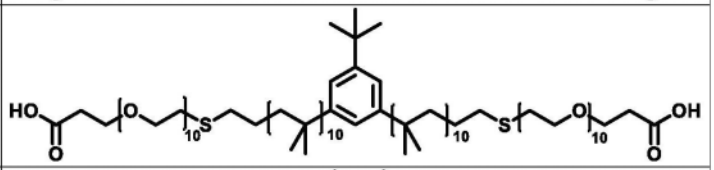
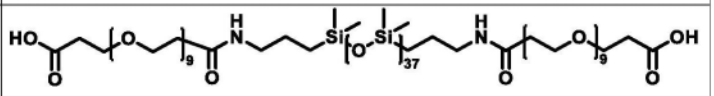
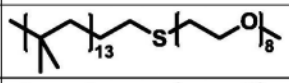
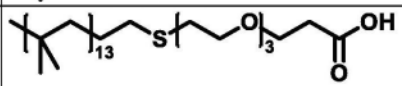
[0198] 膜涂布和纳米孔插入

[0199] 将下表1中列出的共聚物分别以5mg/mL的浓度溶解在辛烷:丁醇(95:5体积)溶剂

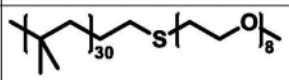
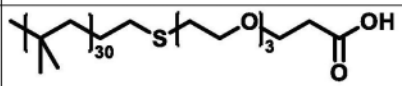
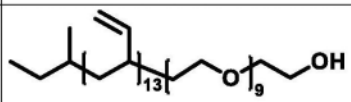
混合物中,然后诸如参考图14A至图14B、图15和图16所述的使用包括圆形孔口的支撑物通过悬挂膜形成(也称为膜涂布)进行测试。

[0200] 表1

[0201]

聚合物	端基	标记	结构
PEO-b-PIB-b-PEO	-CH_3	ABA1	
PEO-b-PIB-b-PEO	-COOH	ABA2	
PEO-b-PIB-b-PEO	-COOH	ABA3	
PEO-b-PDMS-b-PEO	-COOH	ABA4	
PEO-b-PIB	-CH_3	AB1	
PEO-b-PIB	-CH_3(在PIB上)和-COOH(在PEO上)	AB2	

[0202]

	上)		
PEO-b-PIB	-CH_3(在PIB和PEO两者上)	AB3	
PEO-b-PIB	-CH_3(在PIB上)和-COOH(在PEO上)	AB4	
PEO-b-PBD	-CH_3(在PBD上)和-OH(在PEO上)	P5	

[0203] 使用表征测试来提取被认为与此类膜的纳米孔感测应用相关的度量。这些度量落入诸如稳定性(例如,膜/膜-孔系统抵抗应力测试(包括加速测试)的弹性、测序条件)、通量(例如,膜涂布产率、孔插入和保留产率)和质量(例如,膜-孔电流和噪声水平以及一致性、SNR、膜的电绝缘/泄漏性)的类别中。

[0204] 所进行的第一表征测试集中于膜形成的成功率(膜涂布产率)、膜对击穿电压的电阻、生物孔插入(MspA孔)、嵌段共聚物膜内部的所述孔的所得电流和噪声。这些有助于评估基于PIB-PEO的膜彼此之间以及与由其他聚合物形成的膜之间的性能。

[0205] 就涂布质量而言,所有的PIB-b-PEO嵌段共聚物(AB1、AB2、AB3、AB4)和PEO-b-PIB-

b-PEO嵌段共聚物(ABA1、ABA2、ABA3)可被涂布以形成悬挂膜。通过具有ABA构造的PEO-b-PIB-b-PEO嵌段共聚物实现特别令人满意的性能。例如,图12示出了描述对使用P5、ABA1、AB1、AB2、AB3、AB4和ABA2形成的膜测量的击穿电压的图。对于使用P5形成的膜,在图12中可以看出,在约300mV和更低的电压下,基本上保持完整的膜的归一化数目在0V下的约1.0至300mV下的约0.95的范围内;以及在约350mV和更高的电压下,膜的归一化数目从350mV下的约0.9降低至500mV下的约0.22。对于使用ABA1形成的膜,在图12中可以看出,在约300mV和更低的电压下,基本上保持完整的膜的归一化数目在0V下的约1.0至300mV下的约0.95的范围内;以及在约350mV和更高的电压下,膜的归一化数目从350mV下的约0.9降低至500mV下的约0.5。对于使用ABA2形成的膜,在图12中可以看出,在约300mV和更低的电压下,基本上保持完整的膜的归一化数目在0V下的约1.0至300mV下的约0.95的范围内;以及在约350mV和更高的电压下,膜的归一化数目从350mV下的约0.9降低至500mV下的约0.5。

[0206] 对于使用AB1形成的膜,在图12中可以看出,在约300mV和更低的电压下,基本上保持完整的膜的归一化数目在0V下的约1.0至300mV下的约0.16的范围内;以及在约350mV和更高的电压下,膜的归一化数目从350mV下的约0.16降低至500mV下的约0.04。对于使用AB2形成的膜,在图12中可以看出,在约300mV和更低的电压下,基本上保持完整的膜的归一化数目在0V下的约1.0至300mV下的约0.75的范围内;以及在约350mV和更高的电压下,膜的归一化数目从350mV下的约0.45降低至500mV下的约0.01。对于使用AB3形成的膜,在图12中可以看出,在约300mV和更低的电压下,基本上保持完整的膜的归一化数目在0V下的约1.0至300mV下的约0.9的范围内;以及在约350mV和更高的电压下,膜的归一化数目从350mV下的约0.85降低至500mV下的约0.035。对于使用AB4形成的膜,在图12中可以看出,在约300mV和更低的电压下,基本上保持完整的膜的归一化数目在0V下的约1.0至300mV下的约0.97的范围内;以及在约350mV和更高的电压下,膜的归一化数目从350mV下的约0.9降低至500mV下的约0.65。

[0207] 从图12所示的曲线图可以理解,ABA嵌段共聚物ABA1和ABA2以及AB4嵌段共聚物对击穿电压应力测试显示出特别高的弹性。

[0208] 膜之间的另一个差异是将单个纳米孔插入该膜中有多困难。对于诸如参考图4至图7和图17所述的纳米孔测序,在每个膜中插入单个纳米孔是有用的。

[0209] 图13示出了在1M KCl+50mM HEPES缓冲液中MspA纳米孔/膜构建体稳定性的图。对于使用其中插入有MspA纳米孔的P5形成的膜,在图13中可以看出,在100mV的电压下,膜-孔构建体具有范围在约92pA和约97pA之间的电流。对于使用其中插入有MspA纳米孔的ABA1形成的膜,在图13中可以看出,在100mV的电压下,膜-孔构建体具有范围在约89pA和约104pA之间的电流。对于使用其中插入有MspA纳米孔的ABA2形成的膜,在图13中可以看出,在100mV的电压下,膜-孔构建体具有范围在约87pA和约110pA之间的电流。对于使用其中插入有MspA纳米孔的AB1形成的膜,在图13中可以看出,在100mV的电压下,膜-孔构建体具有范围在约104pA和约135pA之间的电流。对于使用其中插入有MspA纳米孔的AB2形成的膜,在图13中可以看出,在100mV的电压下,膜-孔构建体具有范围在约100pA和约105pA之间的电流。对于使用其中插入有MspA纳米孔的AB3形成的膜,在图13中可以看出,在100mV的电压下,膜-孔构建体具有范围在约94pA和约107pA之间的电流。对于使用其中插入有MspA纳米孔的AB4形成的膜,在图13中可以看出,在100mV的电压下,膜-孔构建体具有范围在约96pA和约

110pA之间的电流。

[0210] ABA2膜和ABA3膜被鉴定为具有特别好的性能。ABA2中显示的显著改进是膜弹性的增强。ABA3中显示的显著改进是单个MspA纳米孔向膜中的插入和保留的增强,具有较低的可变性。膜的各种性质示于下表2中。

[0211] 表2

[0212]

类别	性质	ABA4	ABA2	ABA3
膜质量	450mV 下的膜存活率(%)	95%	100%	100%
MspA 纳米孔电流	开孔电流（50μm 孔，100mV)(pA)	104pA	103pA	104pA
	膜-孔（MP）RMS 噪声(pA)	2.13pA	1.46pA	1.62pA
	孔+膜 SNR	49	71	64
产率	膜涂布产率（形成的膜的数目除以试图形成膜的数目)(%)	>95%	>95%	>95%
	孔插入电压(mV)	500mV-850mV	800mV-1000mV	350mV-450mV
	单孔（SP）百分比（插入步骤后）(%)	>95%	~90%	>95%
	在冲洗（3×250μL）下的 SP 存活率(%)	>95%	>95%	>95%
MspA 纳米孔电流+一致性	开孔电流（400mM KCl，50mV，50μm 孔）(pA)	36.18pA	35.02pA	36.04pA
	SP 电流标准偏差（在 1 个 exp 内)(±pA)	1.93pA	0.8pA	0.4pA
对生化条件的弹性	700mV 至 1200mV/10μs 一在 1200mV 下的膜存活率(%)	~65%	~95%	~95%
	700mV 至 1200mV/10μs 一在 50%膜存活率下的电压（mV）	>1200mV	>1200mV	>1200mV
	700mV 至 1200mV/10μs 一在 50%膜和单孔存活率下的电压(mV)	1000mV	1000mV	900mV

[0213] 通过在跨屏障的450mV电流下的膜存活率来测量膜质量。ABA2和ABA3都具有100％的存活率,而ABA4具有大约95％的存活率。

[0214] 还测量了当插入MspA纳米孔时通过膜的电流。在跨屏障的100mV电压下测量开孔电流。ABA2和ABA3分别具有103pA和104pA的类似电流,并且ABA4具有104pA的电流。在将MspA纳米孔插入膜中之后,也以类似方式测量通过屏障的电流噪声的均方根(RMS)平均值。ABA2和ABA3分别具有1.46pA和1.62pA的类似RMS电流噪声平均值,并且ABA4具有2.13pA的RNS电流噪声。也以类似的方式测量通过屏障的电流的信噪比(SNR)。ABA2和ABA3分别具有71和64的SNR,并且ABA4具有49的SNR。

[0215] 还测量了各种产率百分比。ABA2、ABA3和ABA4都具有大于95％的膜涂布产率。也以类似方式测量将MspA纳米孔插入膜中所需的电压。ABA2需要约800mV和约1000mV之间的电压,而ABA3需要约350mV和约450mV之间的电压,并且ABA4需要约500mV和约850mV之间的电压。在进行纳米孔插入步骤后,含有MspA纳米孔的膜的百分比对于ABA2为约90％,对于ABA3为大于95％,并且对于ABA4为大于95％。还以类似的方式测量在冲洗中幸存的单孔膜的百分比。具体地,在测定存活率之前,用250μL的流体冲洗膜三次。ABA2和ABA3均具有大于95％的存活率,ABA4也是如此。

[0216] 还测量了MspA纳米孔在膜内的开孔电流扩散的紧密度。具体地,在400mM KCl和施加50mV的跨膜电流时测量电流。ABA2和ABA3分别具有35.02pA和36.04pA的开孔电流,并且

ABA4具有36.18pA的开孔电流。以类似的方式测量电流的标准偏差。ABA2和ABA3分别具有0.8pA和0.4pA的标准偏差,并且ABA4具有1.93pA的标准偏差。还测量了屏障的弹性。在屏障经受由一系列正电压微脉冲组成的波形之后测量膜存活率,这些正电压微脉冲被-100mV的负电压周期间隔100ms。该系列正电压脉冲总共具有20个脉冲,持续时间为10μs。它们之间的间隔具有30ms的设定持续时间值和保持在+50mV的电压。在第一循环期间,连续地施加波形5分钟,并且脉冲的幅度保持在+700mV。在进一步施加的循环中(再次施加,每次5分钟),脉冲强度以100mV的步长从+700mV增加到+1200mV,总共六个循环。应用所述波形后,ABA2和ABA3均具有约95%的存活率,而ABA4具有约65%的存活率。在相同的实验/测试中,测定在经受所述波形后50%的膜存活的电压。对于ABA2、ABA3和AB4,电压测定为大于1200mV。在另一个测试/实验中,重复相同的波形循环/测试,但是在插入单个MspA孔后使用膜。对于ABA2和ABA4,电压测定为约1000mV,而对于ABA3,电压测定为约900mV。

[0217] 基于为评估用于纳米孔测序应用的聚合物膜的适合性而选择的不同度量,这些结果表明包含PIB作为疏水性B嵌段的膜的性能特别适用于此类应用。例如,不同的度量表明,使用PIB作为疏水性B嵌段的ABA和AB共聚物,特别是包含-COOH作为端基的那些共聚物,可形成具有用于纳米孔测序应用的有用性质的膜,包括相对高的膜形成产率、相对高的孔插入和保留产率、在测序条件下相对高的稳定性以及对于高读取质量而言的相对良好的电性质。本发明人相信,此类性质可能与流通池制造的容易程度、仪器吞吐量、仪器/芯片可靠性和高读取精度相关,这对于纳米孔测序装置的商业制造和使用可能是重要的,例如,如参考图4至图7和图17所述。

[0218] 本主题的某些方面在以下条款中表达。除非在权利要求中明确地陈述,否则本发明并不旨在限于这些条款。

[0219] 条款1.一种在第一流体和第二流体之间的屏障,所述屏障包括:

[0220] 第一层,所述第一层包含二嵌段共聚物的第一多个分子,

[0221] 所述二嵌段共聚物的每个分子包括与亲水性嵌段偶联的疏水性嵌段;和

[0222] 第二层,所述第二层包含所述二嵌段共聚物的第二多个分子,

[0223] 所述第一多个分子的所述亲水性嵌段形成所述屏障的第一外表面,

[0224] 所述第二多个分子的所述亲水性嵌段形成所述屏障的第二外表面,并且

[0225] 所述第一和第二多个分子的所述疏水性嵌段在所述屏障内彼此接触。

[0226] 条款2.根据条款1所述的屏障,其中所述亲水性嵌段的长度大约为A,所述疏水性嵌段的长度大约为B,所述第一层和第二层各自具有大约A+B的厚度,并且所述屏障具有大约2A+2B的厚度。

[0227] 条款3.根据条款2所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约100个重复单元。

[0228] 条款4.根据条款2或条款3所述的屏障,其中所述长度A为约5个重复单元至约15个重复单元。

[0229] 条款5.根据条款2至4中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约100个重复单元。

[0230] 条款6.根据条款2至5中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约50个重复单元。

[0231] 条款7.根据条款2至6中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约10个重复单元至约15个重复单元。

[0232] 条款8.根据条款1至7中任一项所述的屏障,其中所述亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、

[0233] 聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。条款9.根据条款8所述的屏障,其中所述聚丙烯酰胺选自由以下项组成的组:聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。

[0234] 条款10.根据条款1至9中任一项所述的屏障,其中所述疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)

[0235] (PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)

[0236] (PIB)。

[0237] 条款11.根据条款1至10中任一项所述的屏障,所述分子中的每个分子还包括将所述疏水性嵌段偶联至所述亲水性嵌段的接头。条款12.根据条款11所述的屏障,其中所述接头包括至少一个选自由以下项组成的组的部分:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0238] 条款13.一种设备,所述设备包括:

[0239] 容纳第一和第二流体的流体孔;

[0240] 设置在所述流体孔中的所述第一流体和第二流体之间的根据条款1至12中任一项所述的屏障;和设置在所述屏障内并且提供将所述第一流体和所述第二流体流体联接的孔口的纳米孔。

[0241] 条款14.根据条款13所述的装置,其中所述第一流体具有第一组合物并且所述第二流体具有不同于所述第一组合物的第二组合物。

[0242] 条款15.根据条款14所述的装置,其中所述第一流体具有第一浓度的盐,并且所述第二流体具有不同于所述第一浓度的第二浓度的所述盐。

[0243] 条款16.一种制造根据条款13至15中任一项所述的装置的方法,所述方法包括:

[0244] 在所述流体孔中形成所述屏障;以及

[0245] 将所述纳米孔插入所述屏障内。

[0246] 条款17.根据条款16所述的方法,其中形成所述屏障包括涂布。

[0247] 条款18.根据条款17所述的方法,其中所述涂布包括选自由以下项组成的组的技术:刷涂、机械涂布和气泡涂布。

[0248] 条款19.根据条款16至18中任一项所述的方法,其中插入所述纳米孔包括选自由以下项组成的组的技术:电穿孔、移液泵循环和洗涤剂辅助的孔插入。

[0249] 条款20.一种制造二嵌段共聚物的方法,所述方法包括:

[0250] 聚合多种亲水性单体以形成亲水性聚合物;

[0251] 在亲水性聚合物的末端形成引发剂;以及

[0252] 使用所述引发剂聚合多种疏水性单体以形成与所述亲水性聚合物偶联的疏水性聚合物。

[0253] 条款21.一种制造二嵌段共聚物的方法,所述方法包括:

[0254] 聚合多种疏水性单体以形成疏水性聚合物;

[0255] 在该疏水性聚合物的末端形成引发剂;以及使用所述引发剂聚合多种亲水性单体以形成与所述疏水性聚合物偶联的亲水性聚合物。

[0256] 条款22.根据条款20或条款21所述的方法,其中所述引发剂包括溴、碘或氯。

[0257] 条款23.根据条款20或条款21所述的方法,其中所述引发剂包括链转移剂。

[0258] 条款24.根据条款23所述的方法,其中所述链转移剂包括S-1-十二烷基-S'-(α,α'-二甲基-α"-醋酸)三硫代碳酸酯(DDMAT)。条款25.根据条款20至24中任一项所述的方法,其中所述亲水性聚合物包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)

[0259] (PEO)。

[0260] 条款26.根据条款25所述的方法,其中所述聚丙烯酰胺选自由以下项组成的组:聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。

[0261] 条款27.根据条款20至26中任一项所述的方法,其中所述疏水性聚合物包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)

[0262] (PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)

[0263] (PIB)。

[0264] 条款28.根据条款20至27中任一项所述的方法,其中所述疏水性聚合物通过接头偶联到所述亲水性聚合物。

[0265] 条款29.根据条款28所述的方法,其中所述接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0266] 条款30.一种制造二嵌段共聚物的方法,所述方法包括:

[0267] 聚合多种亲水性单体以形成亲水性聚合物;

[0268] 聚合多种疏水性单体以形成疏水性聚合物;以及

[0269] 将所述亲水性聚合物与所述疏水性聚合物偶联。

[0270] 条款31.根据条款30所述的方法,其中所述亲水性聚合物的末端包括第一反应性部分,并且所述疏水性聚合物的末端包括第二反应性部分,所述第二反应性部分与所述第一反应性部分反应以将所述亲水性聚合物与所述疏水性聚合物偶联。

[0271] 条款32.根据条款31所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括叠氮化物,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括炔。

[0272] 条款33.根据条款31所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括硫醇,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括烯烃。

[0273] 条款34.根据条款31所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括硫醇,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括炔。

[0274] 条款35.根据条款31所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括胺,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括N-羟基琥珀酰亚胺。

[0275] 条款36.根据条款30至35中任一项所述的方法,其中所述亲水性聚合物包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)

[0276] (PEO)。

[0277] 条款37.根据条款36所述的方法,其中所述聚丙烯酰胺选自由以下项组成的组:聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。

[0278] 条款38.根据条款30至37中任一项所述的方法,其中所述疏水性聚合物包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)

[0279] (PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)

[0280] (PIB)。

[0281] 条款39.根据条款30至38中任一项所述的方法,其中所述疏水性聚合物通过接头偶联到所述亲水性聚合物。

[0282] 条款40.根据条款39所述的方法,其中所述接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0283] 条款41.一种在第一流体和第二流体之间的屏障,所述屏障包括:

[0284] 第一层,所述第一层包含三嵌段共聚物的第一多个分子,所述三嵌段共聚物的每个分子包括第一和第二疏水性嵌段以及设置在所述第一和第二疏水性嵌段之间的亲水性嵌段;和

[0285] 第二层,所述第二层包含所述三嵌段共聚物的第二多个分子,

[0286] 所述第一多个分子的所述亲水性嵌段形成所述屏障的第一外表面,

[0287] 所述第二多个分子的所述亲水性嵌段形成所述屏障的第二外表面,并且

[0288] 所述第一和第二多个分子的所述疏水性嵌段在所述屏障内彼此接触。

[0289] 条款42.根据条款41所述的屏障,其中所述亲水性嵌段的长度大约为A,每个疏水性嵌段的长度大约为B,所述第一层和第二层各自具有大约A/2+B的厚度,并且所述屏障具有大约A+2B的厚度。

[0290] 条款43.根据条款42所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约100个重复单元。

[0291] 条款44.根据条款42或条款43所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约50个重复单元。

[0292] 条款45.根据条款42至44中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约5个重复单元至约20个重复单元。

[0293] 条款46.根据条款42至45中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约13个重复单元至约19个重复单元。

[0294] 条款47.根据条款42至45中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约7个重复单元至约13个重复单元。

[0295] 条款48.根据条款42或条款43所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约30个重复单元。

[0296] 条款49.根据条款42至43或条款48中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约15个重复单元。

[0297] 条款50.根据条款42至43或条款48至49中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约7个重复单元至约11个重复单元。

[0298] 条款51.根据条款42至43或条款48至49中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约5个重复单元。

[0299] 条款52.根据条款42至51中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约100个重复单元。

[0300] 条款53.根据条款42至52中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约50个重复单元。

[0301] 条款54.根据条款42至53中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约15个重复单元。

[0302] 条款55.根据条款42至54中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约5个重复单元。

[0303] 条款56.根据条款42至54中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约7个重复单元至约13个重复单元。

[0304] 条款57.根据条款42至52中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约25个重复单元至约45个重复单元。

[0305] 条款58.根据条款42至52或条款57中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约30个重复单元至约40个重复单元。

[0306] 条款59.根据条款42至52或条款57至58中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约35个重复单元至约40个重复单元。

[0307] 条款60.根据条款42至52或条款57至58中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约30个重复单元至约37个重复单元。

[0308] 条款61.根据条款41至60中任一项所述的屏障,其中所述亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、

[0309] 聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。条款62.根据条款61所述的屏障,其中所述聚丙烯酰胺选自由以下项组成的组:聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。

[0310] 条款63.根据条款41至62中任一项所述的屏障,其中所述疏水性嵌段各自包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)

[0311] (PIB)。

[0312] 条款64.根据条款41至63中任一项所述的屏障,所述第一和第二多个分子的所述分子中的每个分子还包括将每个疏水性嵌段偶联至所述亲水性嵌段的接头。

[0313] 条款65.根据条款64所述的屏障,其中所述接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0314] 条款66.一种设备,所述设备包括:

[0315] 容纳第一和第二流体的流体孔;

[0316] 设置在所述流体孔中的所述第一流体和第二流体之间的根据条款41至65中任一项所述的屏障;和

[0317] 设置在所述屏障内并且提供将所述第一流体和所述第二流体流体联接的孔口的纳米孔。

[0318] 条款67.根据条款66所述的装置,其中所述第一流体具有第一组合物并且所述第二流体具有不同于所述第一组合物的第二组合物。

[0319] 条款68.根据条款67所述的装置,其中所述第一流体具有第一浓度的盐,并且所述第二流体具有不同于所述第一浓度的第二浓度的所述盐。

[0320] 条款69.一种制造根据条款66至68中任一项所述的装置的方法,所述方法包括:

[0321] 在所述流体孔中形成所述屏障;以及

[0322] 将所述纳米孔插入所述屏障内。

[0323] 条款70.根据条款69所述的方法,其中形成所述屏障包括涂布。条款71.根据条款70所述的方法,其中所述涂布包括选自由以下项组成的组的技术:刷涂、机械涂布和气泡涂布。

[0324] 条款72.根据条款69至71中任一项所述的方法,其中插入所述纳米孔包括选自由以下项组成的组的技术:电穿孔、移液泵循环和洗涤剂辅助的孔选择。

[0325] 条款73.一种制造三嵌段共聚物的方法,所述方法包括:

[0326] 聚合多种亲水性单体以形成亲水性聚合物;

[0327] 在亲水性聚合物的相应末端形成引发剂;以及

[0328] 使用所述引发剂聚合多种疏水性单体以形成与所述亲水性聚合物的每个末端偶联的疏水性聚合物。

[0329] 条款74.根据条款73所述的方法,其中所述引发剂各自包括溴、碘或氯。

[0330] 条款75.根据条款73或条款74所述的方法,其中所述引发剂各自包括链转移剂。

[0331] 条款76.根据条款75所述的方法,其中所述链转移剂包括S-1-十二烷基-S'-(α,α'-二甲基-α"-醋酸)三硫代碳酸酯(DDMAT)。

[0332] 条款77.根据条款73至76中任一项所述的方法,其中所述亲水性聚合物包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)

[0333] (PEO)。

[0334] 条款78.根据条款77所述的方法,其中所述聚丙烯酰胺选自由以下项组成的组:聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。

[0335] 条款79.根据条款73至78中任一项所述的方法,其中所述疏水性聚合物各自包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)(PIB)。

[0336] 条款80.根据条款73至79中任一项所述的方法,其中所述疏水性聚合物各自通过接头偶联到所述亲水性聚合物。

[0337] 条款81.根据条款80所述的方法,其中所述接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0338] 条款82.一种制造三嵌段共聚物的方法,所述方法包括:

[0339] 聚合多种亲水性单体以形成具有末端的亲水性聚合物;

[0340] 聚合多种疏水性单体以形成第一和第二疏水性聚合物;

[0341] 以及

[0342] 将所述第一和第二疏水性聚合物偶联至所述亲水性聚合物的相应末端。

[0343] 条款83.根据条款82所述的方法,其中所述第一和第二疏水性聚合物中的每一者的末端包括第一反应性部分,并且所述亲水性聚合物的每个末端包括第二反应性部分,所述第二反应性部分与所述第一反应性部分反应以将所述第一和第二疏水性聚合物与所述亲水性聚合物偶联。

[0344] 条款84.根据条款83所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括叠氮化物,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括炔。

[0345] 条款85.根据条款83所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括硫醇,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括烯烃。

[0346] 条款86.根据条款83所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括硫醇,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括炔。

[0347] 条款87.根据条款83所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括胺,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括N-羟基琥珀酰亚胺。

[0348] 条款88.根据条款82至87中任一项所述的方法,其中所述亲水性聚合物包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)

[0349] (PEO)。

[0350] 条款89.根据条款88所述的方法,其中所述聚丙烯酰胺选自由以下项组成的组:聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。

[0351] 条款90.根据条款82至89中任一项所述的方法,其中所述第一和第二疏水性聚合物各自包括选自由以下项组成的组的聚合物:

[0352] 聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)。

[0353] 条款91.根据条款82至90中任一项所述的方法,其中所述第一和第二疏水性聚合物各自通过接头偶联到所述亲水性聚合物。条款92.根据条款91所述的方法,其中所述接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0354] 条款93.一种在第一流体和第二流体之间的屏障,所述屏障包括:

[0355] 层,所述层包含三嵌段共聚物的多个分子,

[0356] 所述三嵌段共聚物的每个分子包括第一和第二亲水性嵌段以及设置在所述第一和第二亲水性嵌段之间的疏水性嵌段,所述第一多个分子的所述第一亲水性嵌段形成所述屏障的第一外表面,

[0357] 所述多个分子的所述第二亲水性嵌段形成所述屏障的第二外表面,并且

[0358] 所述多个分子的所述疏水性嵌段在所述屏障内彼此接触。条款94.根据条款93所述的屏障,其中每个亲水性嵌段的长度大约为A,所述疏水性嵌段的长度大约为B,所述层具有大约2A+B的厚度,并且所述屏障具有大约2A+B的厚度。

[0359] 条款95.根据条款94所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约100个重复单元。

[0360] 条款96.根据条款94或条款95所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约50个重复单元。

[0361] 条款97.根据条款94至96中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约5个重复单元至约20个重复单元。

[0362] 条款98.根据条款94至97中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约13个重复单元至约19个重复单元。

[0363] 条款99.根据条款94至97中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约7个重复单元至约13个重复单元。

[0364] 条款100.根据条款94或条款95所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约30个重复单元。

[0365] 条款101.根据条款94至95或条款100中任一项所述的屏障,其中所述长度A为约2个重复单元至约15个重复单元。

[0366] 条款102.根据条款94至95或条款100至101中任一项所述的屏障,

[0367] 其中所述长度A为约7个重复单元至约11个重复单元。条款103.根据条款94至95或条款100至101中任一项所述的屏障,

[0368] 其中所述长度A为约2个重复单元至约5个重复单元。

[0369] 条款104.根据条款94至103中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约100个重复单元。

[0370] 条款105.根据条款94至104中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约50个重复单元。

[0371] 条款106.根据条款94至105中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约15个重复单元。

[0372] 条款107.根据条款94至106中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约2个重复单元至约5个重复单元。

[0373] 条款108.根据条款94至106中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约7个重复单元至约13个重复单元。

[0374] 条款109.根据条款94至104中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约25个重复单元至约45个重复单元。

[0375] 条款110.根据条款94至104或条款109中任一项所述的屏障,其中所述长度B为约30个重复单元至约40个重复单元。

[0376] 条款111.根据条款94至104或条款109至110中任一项所述的屏障,

[0377] 其中所述长度B为约35个重复单元至约40个重复单元。条款112.根据条款94至104或条款109至110中任一项所述的屏障,

[0378] 其中所述长度B为约30个重复单元至约37个重复单元。条款113.根据条款93至112中任一项所述的屏障,其中每个亲水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、

[0379] 聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。条款114.根据条款113所述的屏障,其中所述聚丙烯酰胺选自由以下项组成的组:聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。

[0380] 条款115.根据条款93至114中任一项所述的屏障,其中所述疏水性嵌段包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)

[0381] (PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)

[0382] (PIB)。

[0383] 条款116.根据条款93至115中任一项所述的屏障,所述多个分子的所述分子中的每个分子还包括将所述疏水性嵌段偶联至所述亲水性嵌段中的每个亲水性嵌段的接头。

[0384] 条款117.根据条款116所述的屏障,其中所述接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0385] 条款118.一种设备,所述设备包括:

[0386] 容纳第一和第二流体的流体孔;

[0387] 设置在所述流体孔中的所述第一流体和第二流体之间的根据条款93至117中任一项所述的屏障;和

[0388] 设置在所述屏障内并且提供将所述第一流体和所述第二流体流体联接的孔口的纳米孔。

[0389] 条款119.根据条款118所述的装置,其中所述第一流体具有第一组合物并且所述第二流体具有不同于所述第一组合物的第二组合物。

[0390] 条款120.根据条款119所述的装置,其中所述第一流体具有第一浓度的盐,并且所述第二流体具有不同于所述第一浓度的第二浓度的所述盐。

[0391] 条款121.一种制造根据条款118所述的装置的方法,所述方法包括:

[0392] 在所述流体孔中形成所述屏障;以及

[0393] 将所述纳米孔插入所述屏障内。

[0394] 条款122.根据条款121所述的方法,其中形成所述屏障包括涂布。条款123.根据条款122所述的方法,其中所述涂布包括选自由以下项组成的组的技术:刷涂、机械涂布和气泡涂布。

[0395] 条款124.根据条款121至123中任一项所述的方法,其中插入所述纳米孔包括选自由以下项组成的组的技术:电穿孔、移液泵循环和洗涤剂辅助的孔选择。

[0396] 条款125.一种制造三嵌段共聚物的方法,所述方法包括:

[0397] 聚合多种疏水性单体以形成疏水性聚合物;

[0398] 在疏水性聚合物的相应末端形成引发剂;以及

[0399] 使用所述引发剂聚合多种亲水性单体以形成与所述疏水性聚合物的每个末端偶联的亲水性聚合物。

[0400] 条款126.根据条款125所述的方法,其中所述引发剂各自包括溴、碘或氯。

[0401] 条款127.根据条款125或条款126所述的方法,其中所述引发剂各自包括链转移剂。

[0402] 条款128.根据条款127所述的方法,其中所述链转移剂包括S-1-十二烷基-S'-(α,α'-二甲基-α"-醋酸)三硫代碳酸酯(DDMAT)。条款129.根据条款125至128中任一项所述的方法,其中所述亲水性聚合物各自包括选自由以下项组成的组的聚合物:N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)

[0403] (PEO)。

[0404] 条款130.根据条款129所述的方法,其中所述聚丙烯酰胺选自由以下项组成的组:

聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。

[0405] 条款131.根据条款125至130中任一项所述的方法,其中所述疏水性聚合物包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)

[0406] (PIB)。

[0407] 条款132.根据条款125至131中任一项所述的方法,其中所述疏水性聚合物通过接头偶联到所述亲水性聚合物。

[0408] 条款133.根据条款132所述的方法,其中所述接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0409] 条款134.一种制造三嵌段共聚物的方法,所述方法包括:

[0410] 聚合多种疏水性单体以形成具有末端的疏水性聚合物;

[0411] 聚合多种亲水性单体以形成第一和第二亲水性聚合物;

[0412] 以及

[0413] 将所述第一和第二亲水性聚合物偶联至所述疏水性聚合物的相应末端。

[0414] 条款135.根据条款134所述的方法,其中所述第一和第二亲水性聚合物中的每一者的末端包括第一反应性部分,并且所述疏水性聚合物的每个末端包括第二反应性部分,所述第二反应性部分与所述第一反应性部分反应以将所述第一和第二亲水性聚合物与所述疏水性聚合物偶联。

[0415] 条款136.根据条款135所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括叠氮化物,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括炔。

[0416] 条款137.根据条款135所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括硫醇,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括烯烃。

[0417] 条款138.根据条款135所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括硫醇,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括炔。

[0418] 条款139.根据条款135所述的方法,其中所述第一和第二反应性部分中的一者包括胺,并且所述第一和第二反应性部分中的另一者包括N-羟基琥珀酰亚胺。

[0419] 条款140.根据条款134至139中任一项所述的方法,其中所述第一和第二亲水性聚合物各自包括选自由以下项组成的组的聚合物:

[0420] N-乙烯基吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、两性离子聚合物、多肽和聚(氧乙烯)(PEO)。

[0421] 条款141.根据条款140所述的方法,其中所述聚丙烯酰胺选自由以下项组成的组:聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、带电荷的聚丙烯酰胺以及磷酸官能化的聚丙烯酰胺。

[0422] 条款142.根据条款134至141中任一项所述的方法,其中所述疏水性聚合物包括选自由以下项组成的组的聚合物:聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚丁二烯(PBd)、聚异戊二烯、聚月桂烯、

[0423] 聚氯丁二烯、氢化聚二烯、氟化聚乙烯、多肽和聚(异丁烯)。条款143.根据条款134至142中任一项所述的方法,其中所述第一和第二亲水性聚合物通过接头偶联到所述疏水性聚合物。

[0424] 条款144.根据条款143所述的方法,其中所述接头选自由以下项组成的组:酰胺、硫醚(硫化物)、琥珀酸基、马来酸基、亚甲基、醚和点击反应的产物。

[0425] 另外的注释

[0426] 虽然上文描述了各种说明性示例,但本领域的技术人员将显而易见,可在不脱离本发明的情况下在其中作出各种改变和修改。所附权利要求书打算涵盖落入本发明的真正精神和范围内所有此类改变和修改。

[0427] 应理解,如本文中所描述的本公开的方面中的每一者的任何相应特征/示例可以任何适当组合一起实施,并且来自这些方面中的任一者或多者的任何特征/示例可以与如本文中所描述的其他(多个)方面的特征中的任一者以任何适当组合一起实施,以实现如本文中所描述的益处。

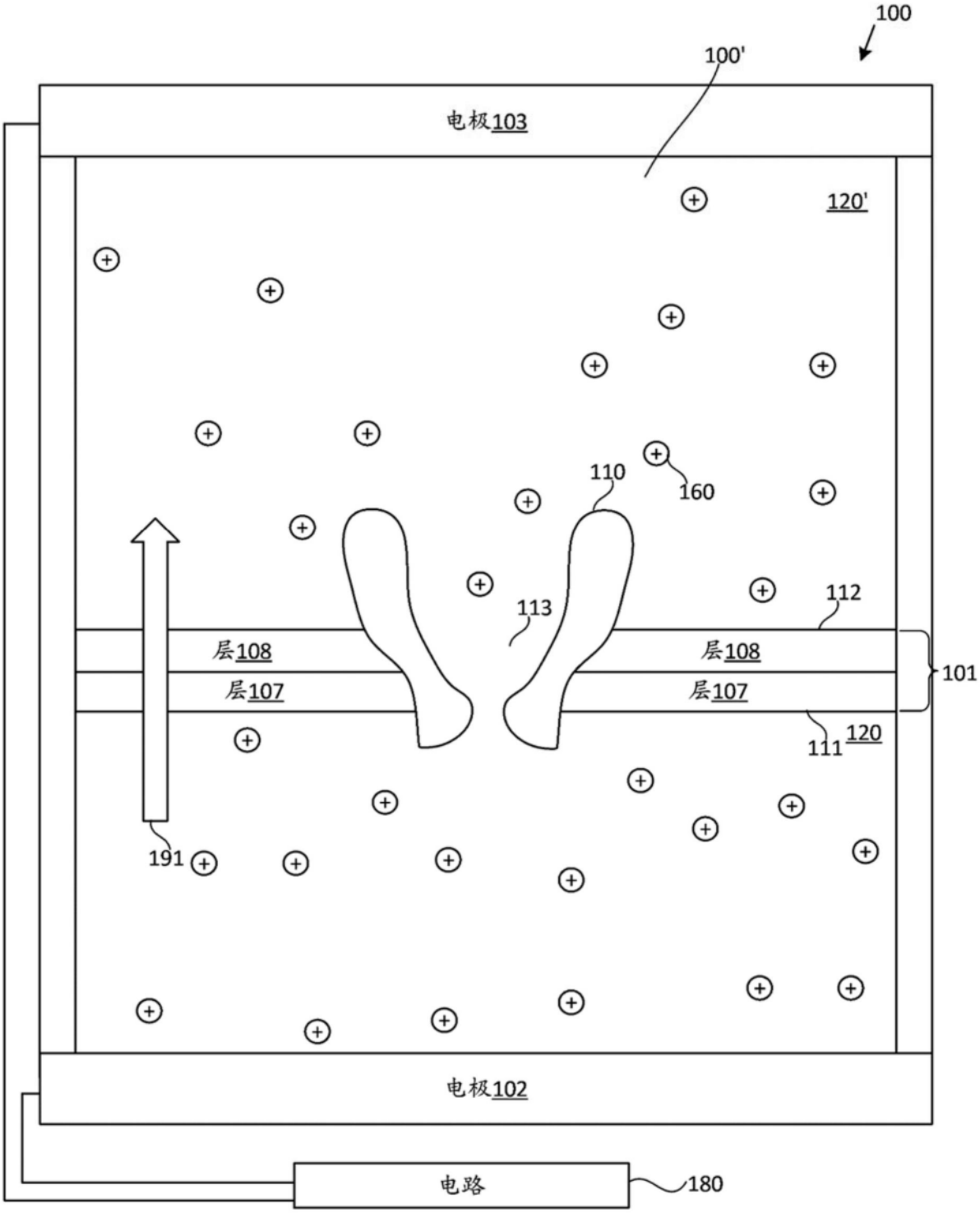

100
100'
电极103
120'
110
160
112
113
层108
层108
层107
层107
101
111
120
191
电极102
电路
180

图1

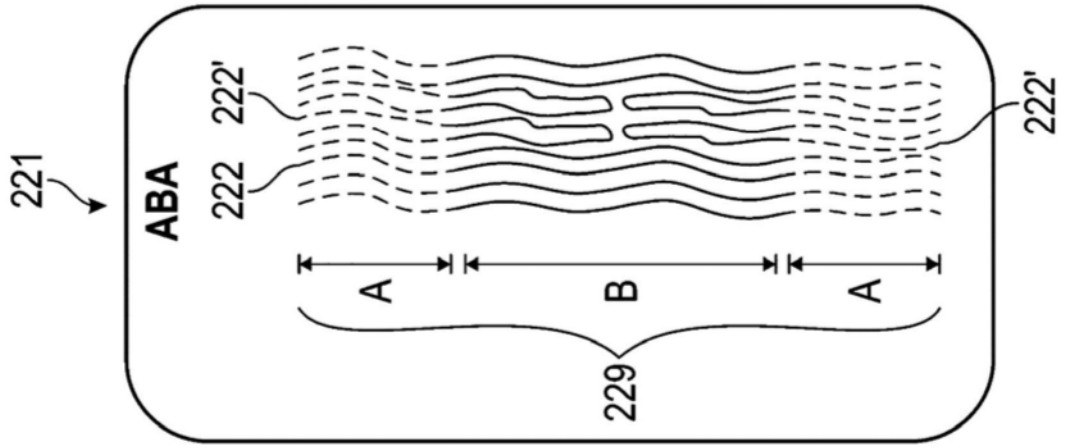

221
ABA
222'
222
222'
A
B
A
229

图2A

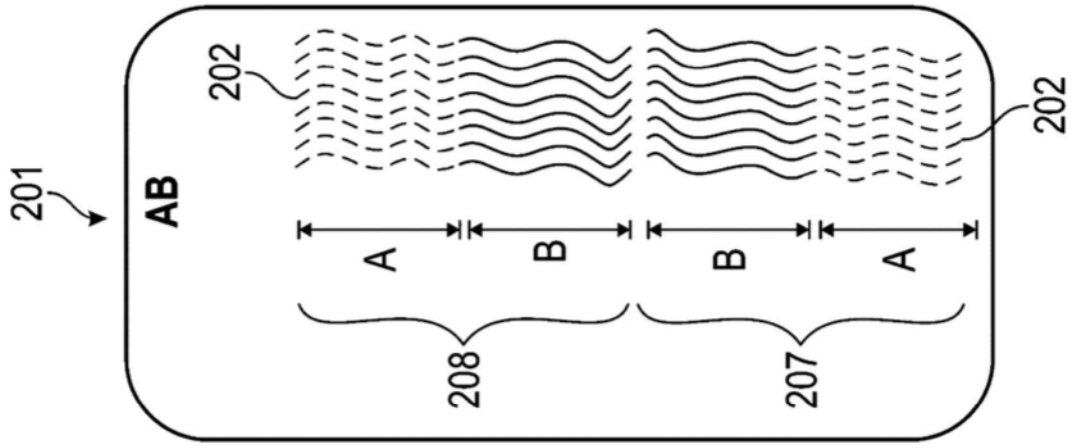

201
AB
202
202
A
B
B
A
208
207

图2B

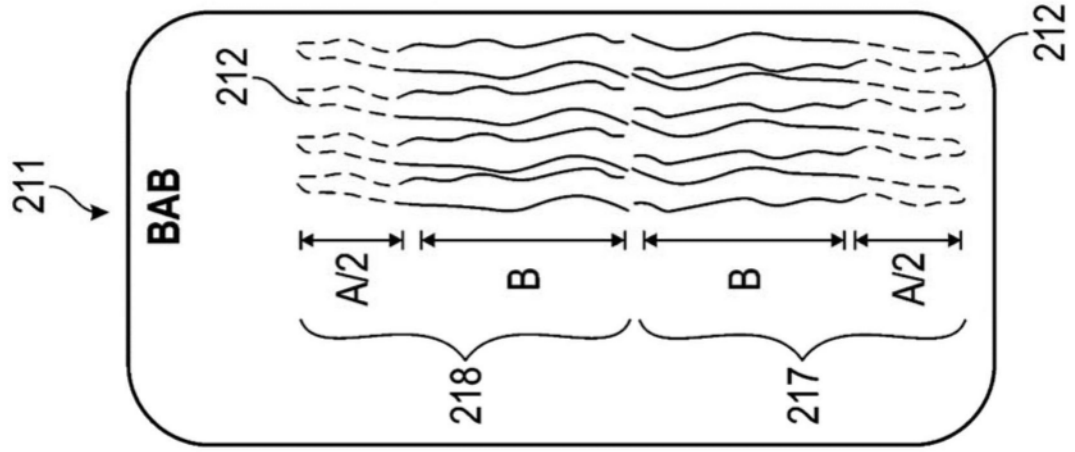

211
BAB
212
212
A/2
B
B
A/2
218
217

图2C



图3A



图3B

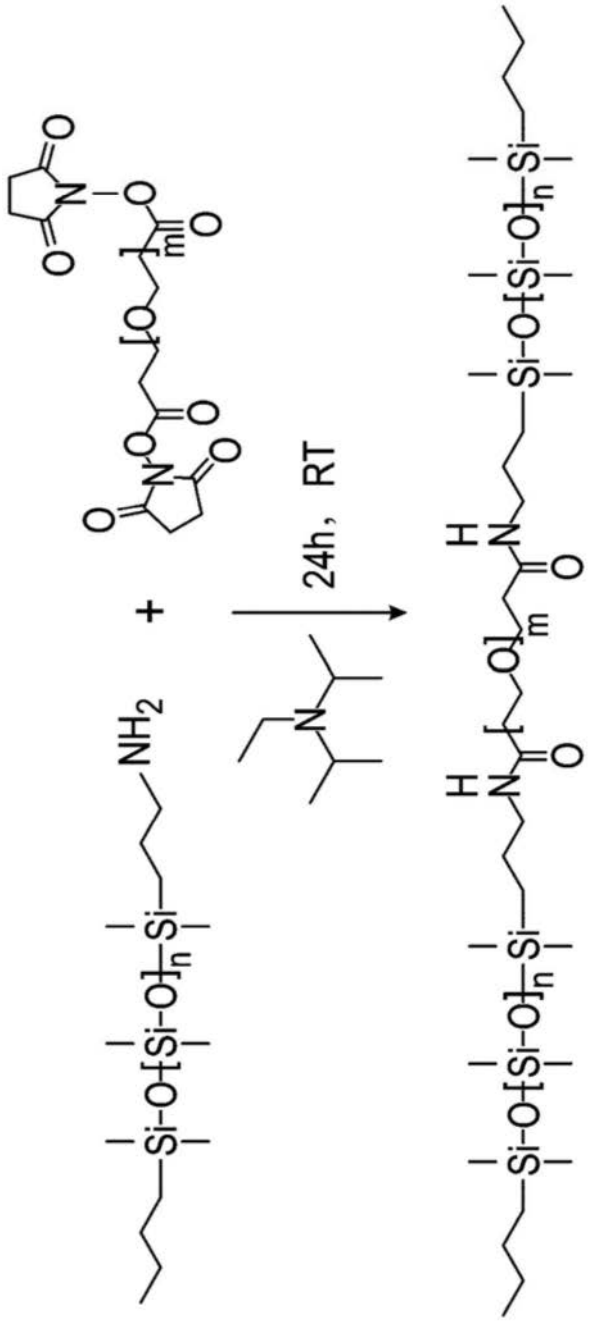


图3C

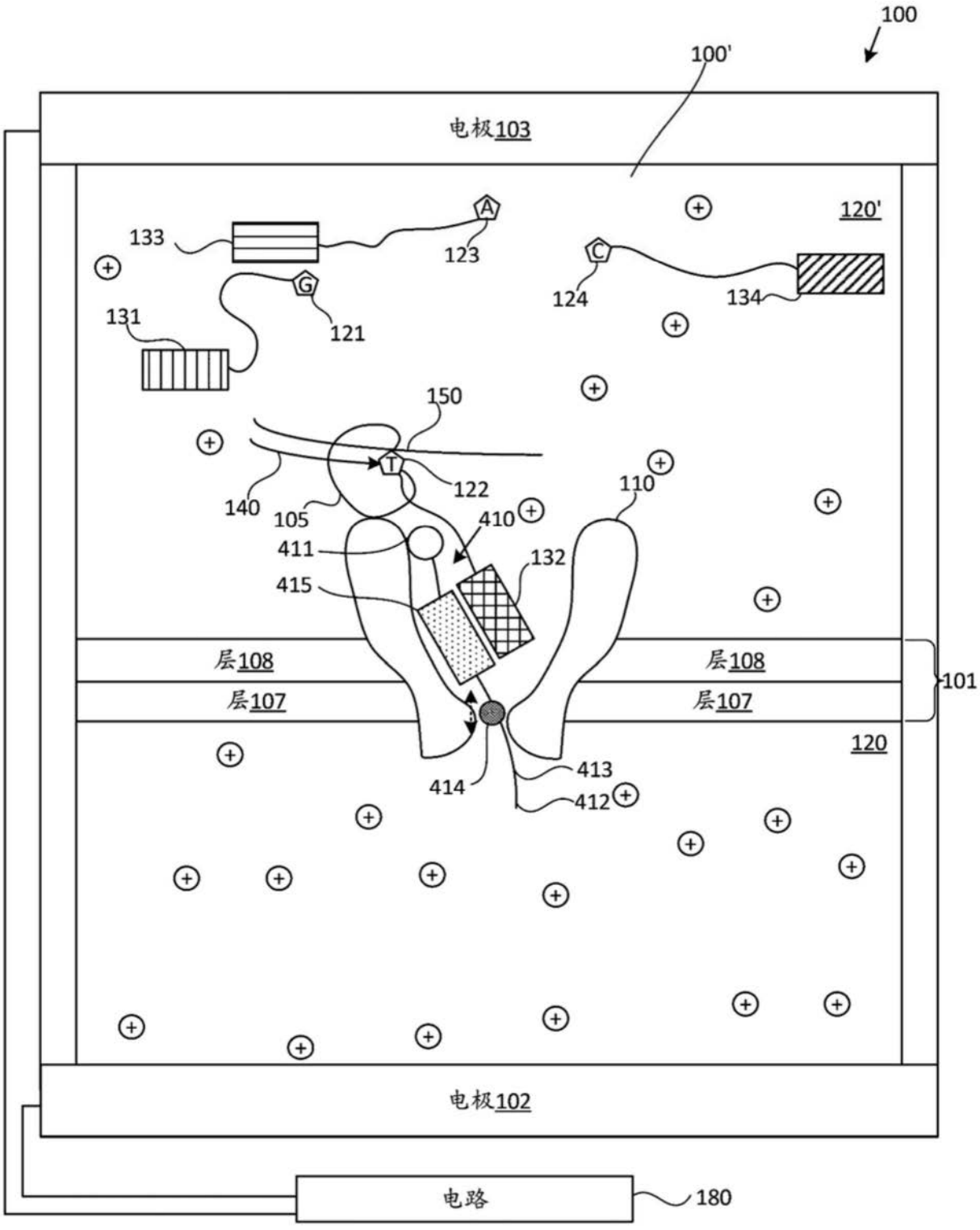

100
100'
电极103
120'
133
123
131
121
124
134
150
122
140
105
410
110
411
132
415
层108
层107
层108
层107
101
120
413
414
412
电极102
电路
180

图4

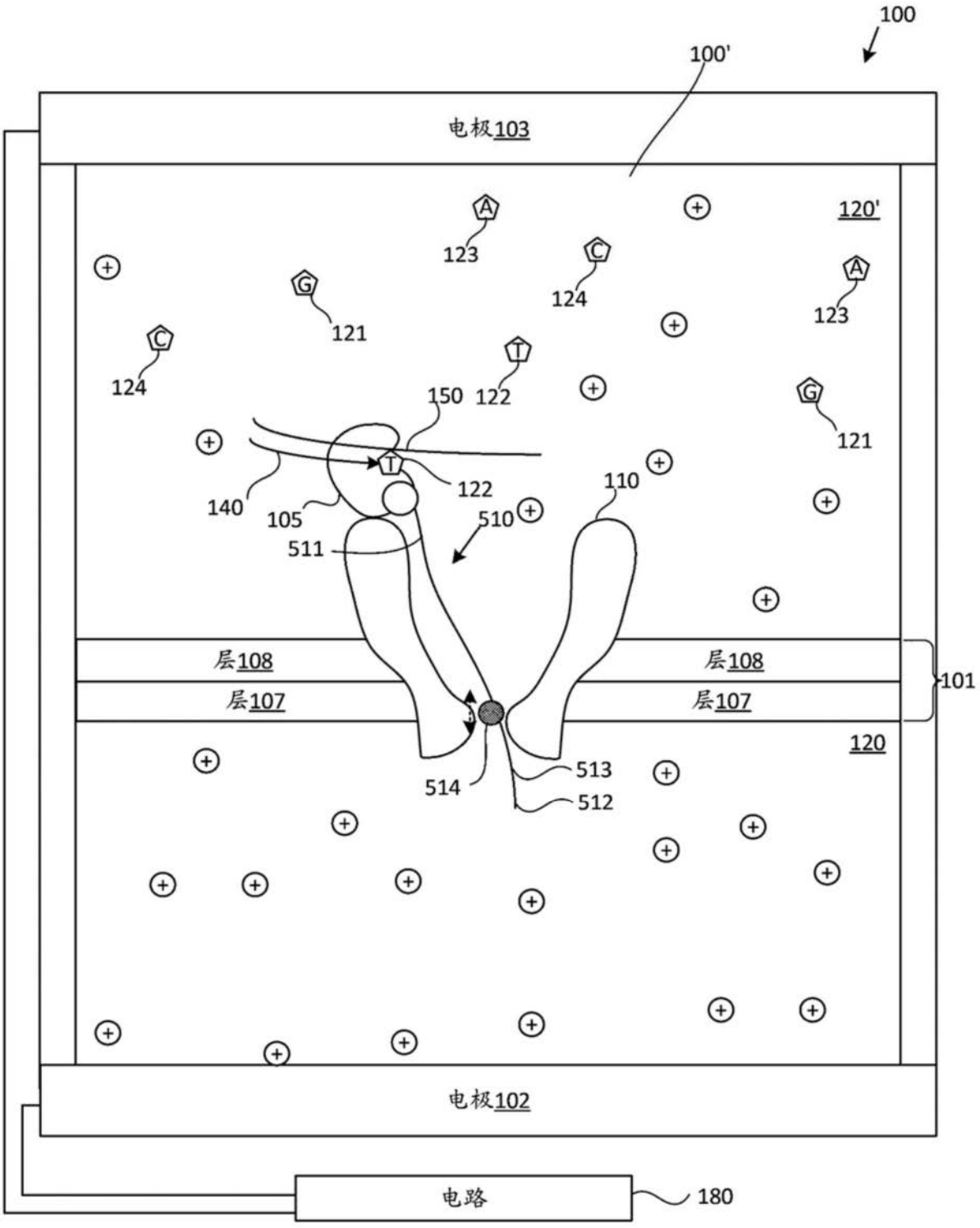

100
100'
电极103
120'
123
124
121
124
123
121
150
122
122
140
105
510
511
110
层108
层107
层108
层107
101
120
513
514
512
电极102
电路
180

图5

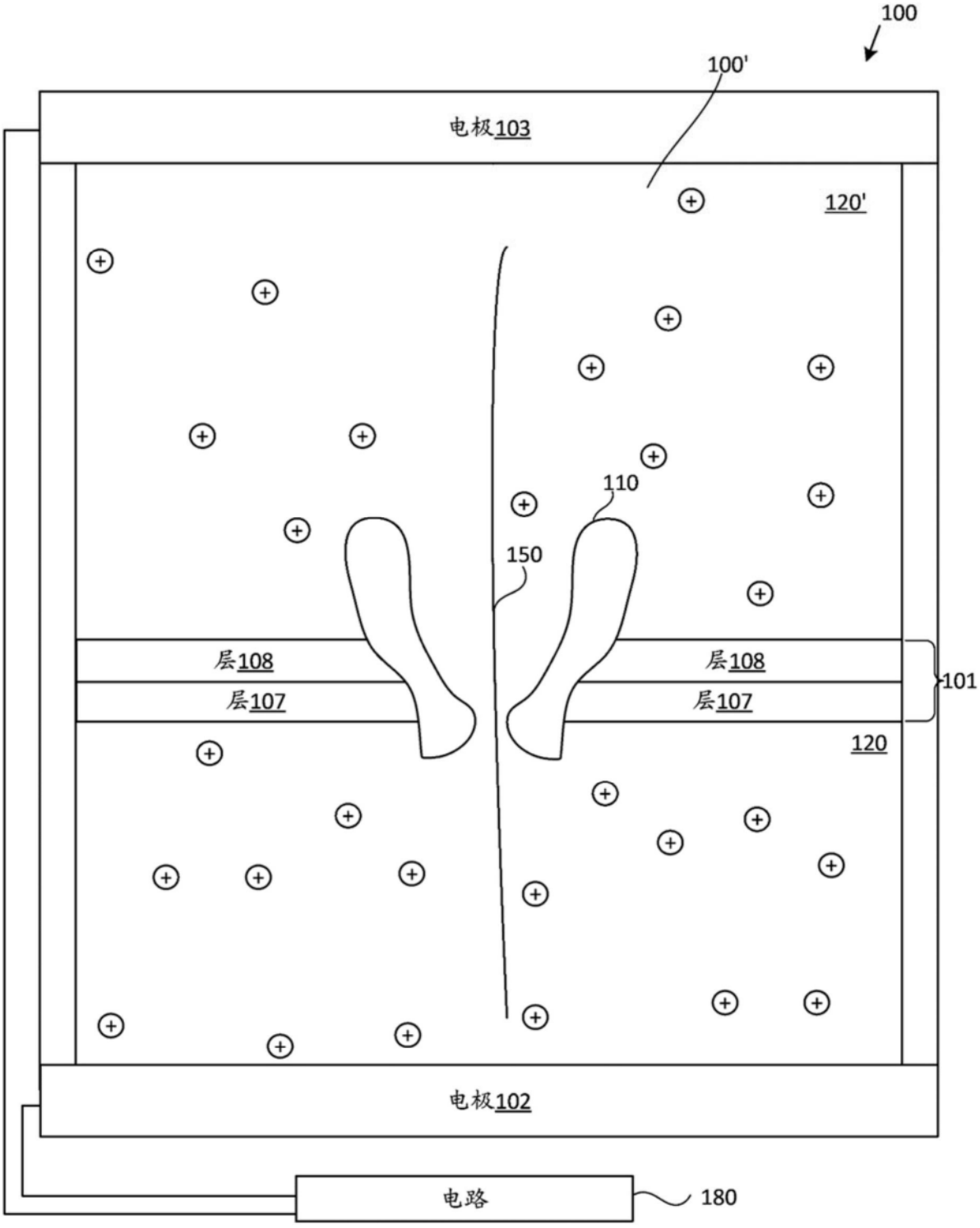

100
100'
电极103
120'
110
150
层108
层107
层108
层107
101
120
电极102
电路
180

图6

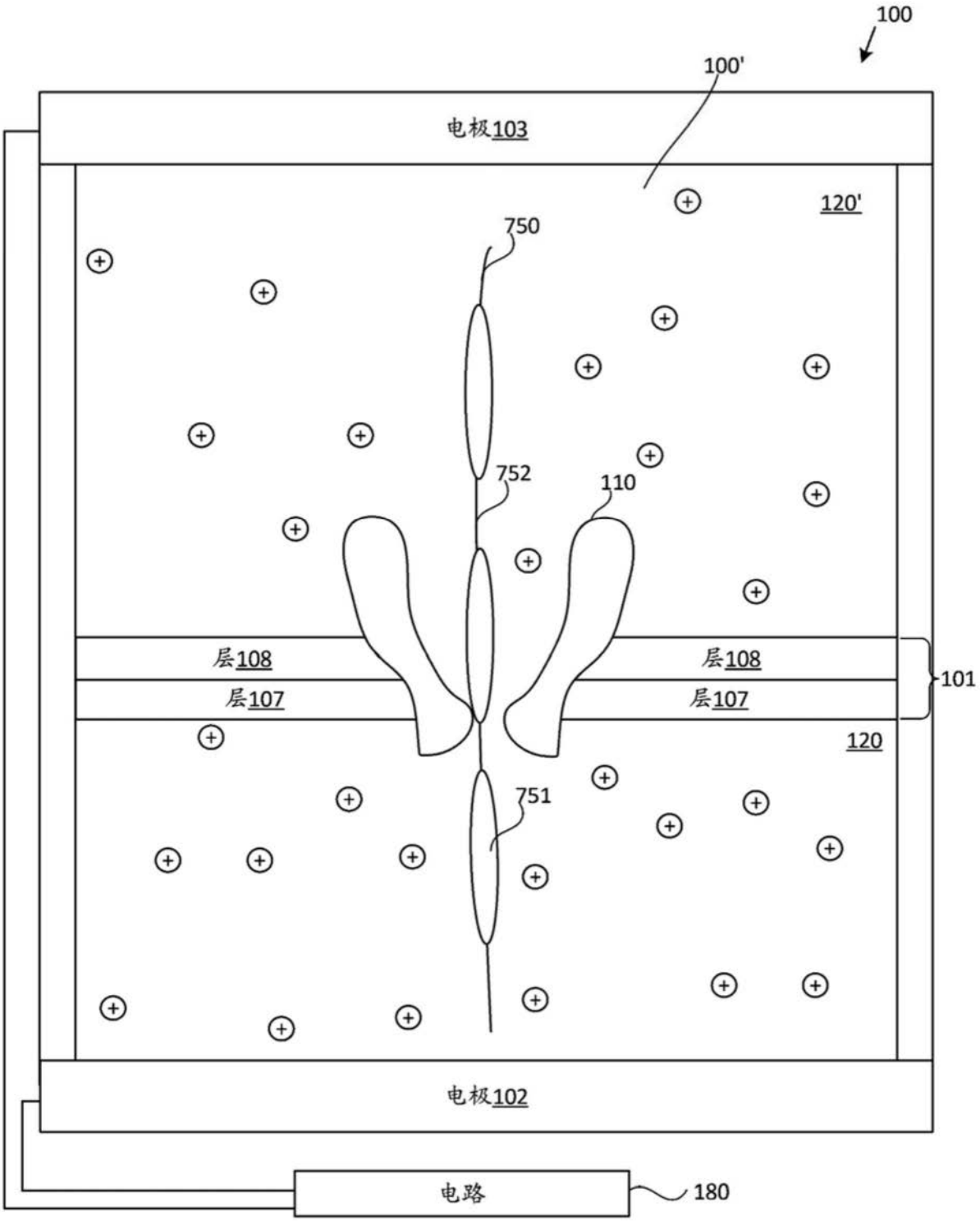

100
100'
电极103
120'
750
752
110
层108
层108
101
层107
层107
120
751
电极102
电路
180

图7

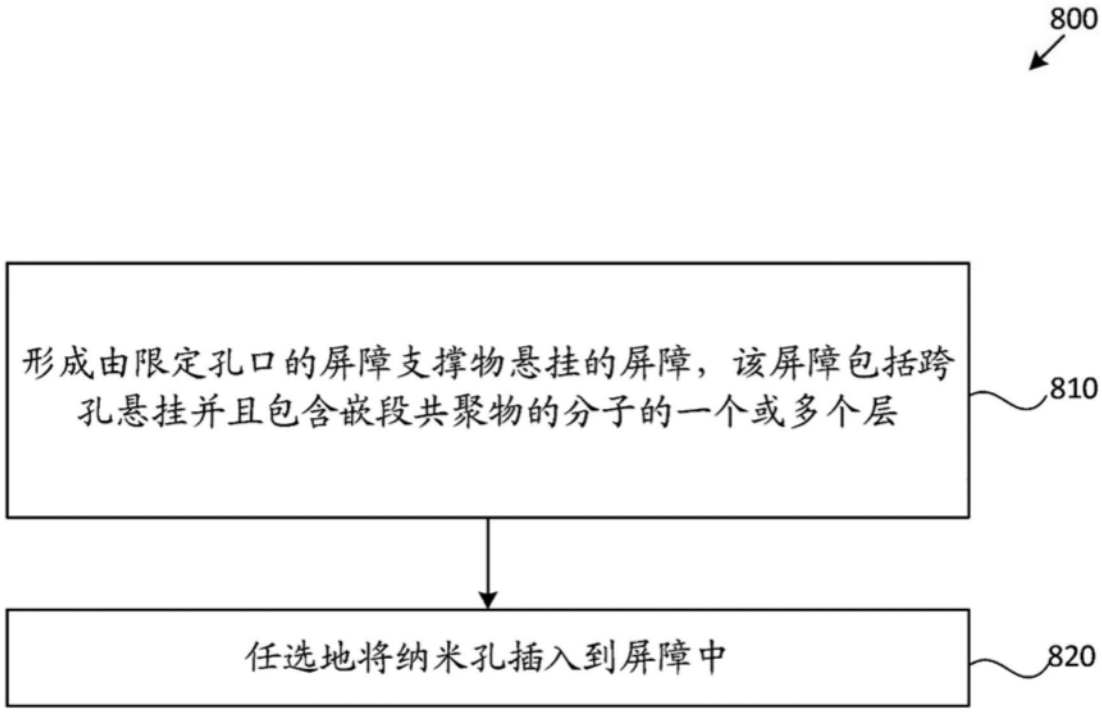
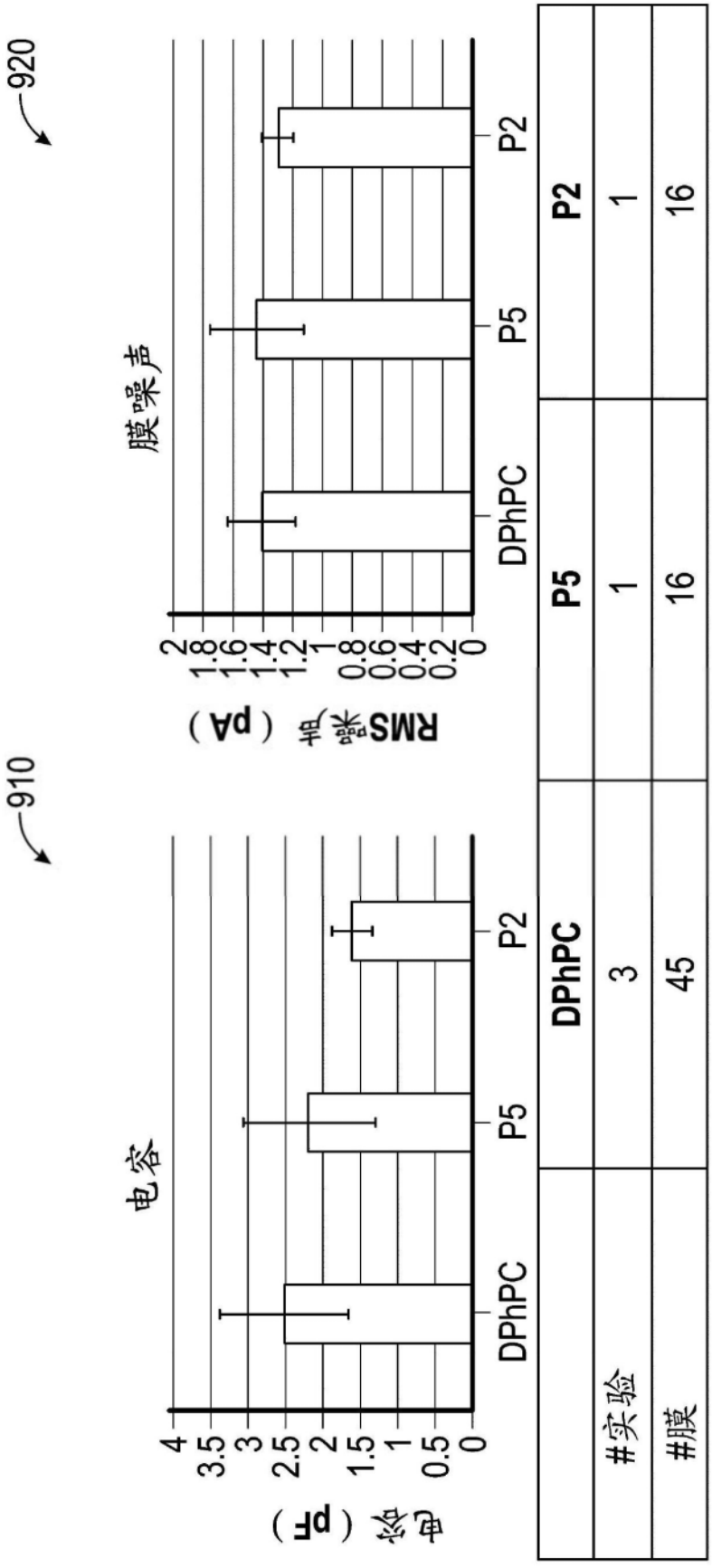

800
形成由限定孔口的屏障支撑物悬挂的屏障，该屏障包括跨孔悬挂并且包含嵌段共聚物的分子的一个或多个层
810
任选地将纳米孔插入到屏障中
820

图8



	DPhPC	P5	P2
#实验	3	1	1
#膜	45	16	16

图9

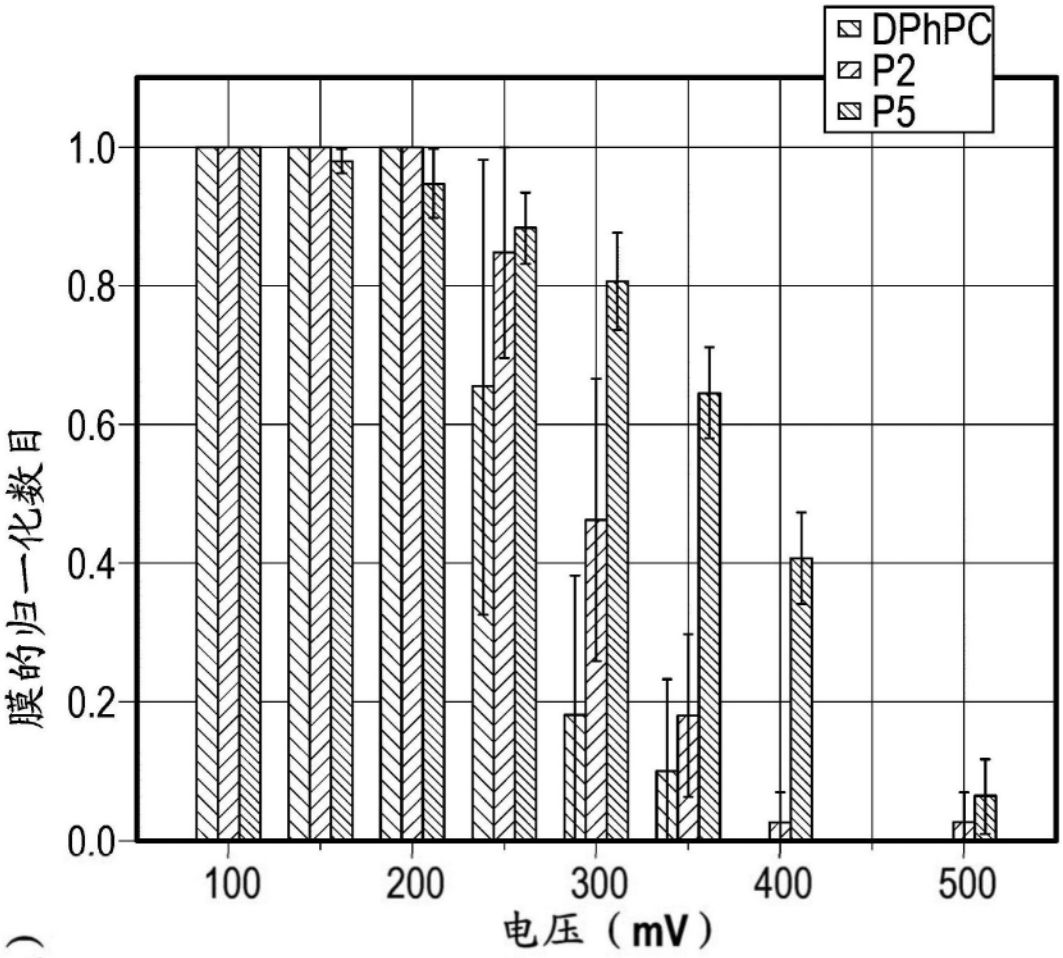

DPhPC
P2
P5
膜的归一化数目
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
100
200
300
400
500
电压（mV）

图10

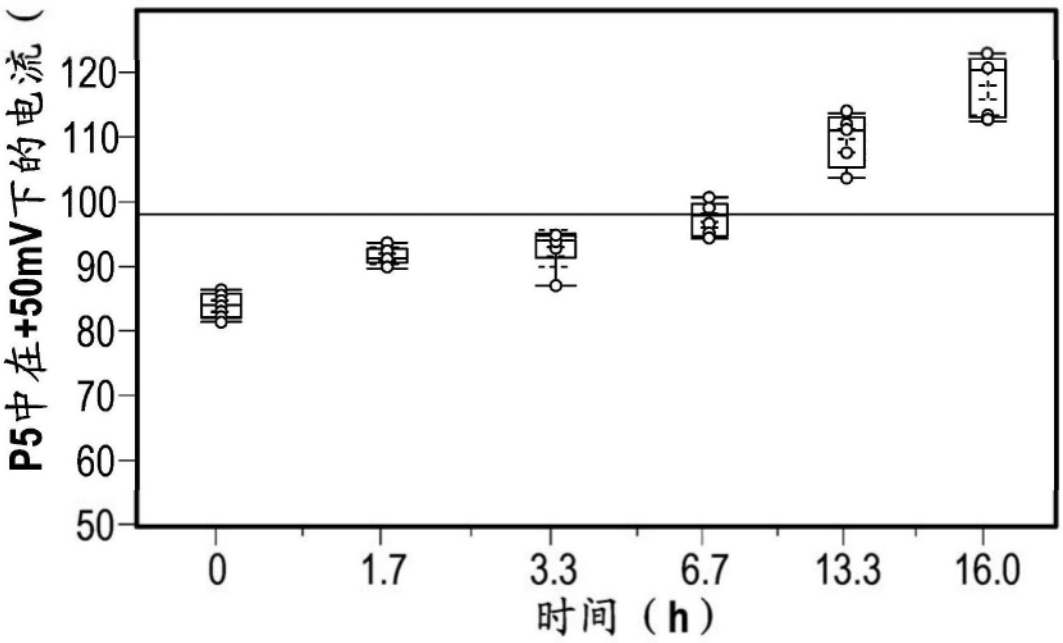

P5中在+50mV下的电流（pA）
120
110
100
90
80
70
60
50
0
1.7
3.3
6.7
13.3
16.0
时间（h）

图11

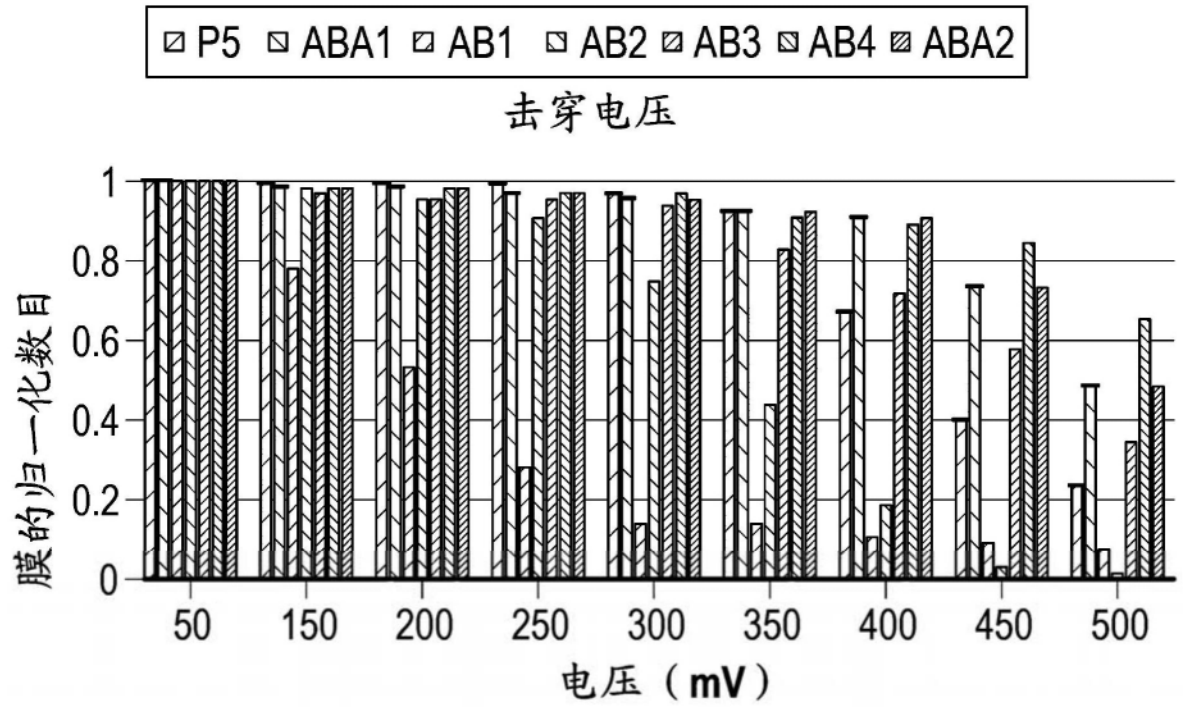

P5 ABA1 AB1 AB2 AB3 AB4 ABA2
击穿电压
膜的归一化数目
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
50 150 200 250 300 350 400 450 500
电压（mV）

图12

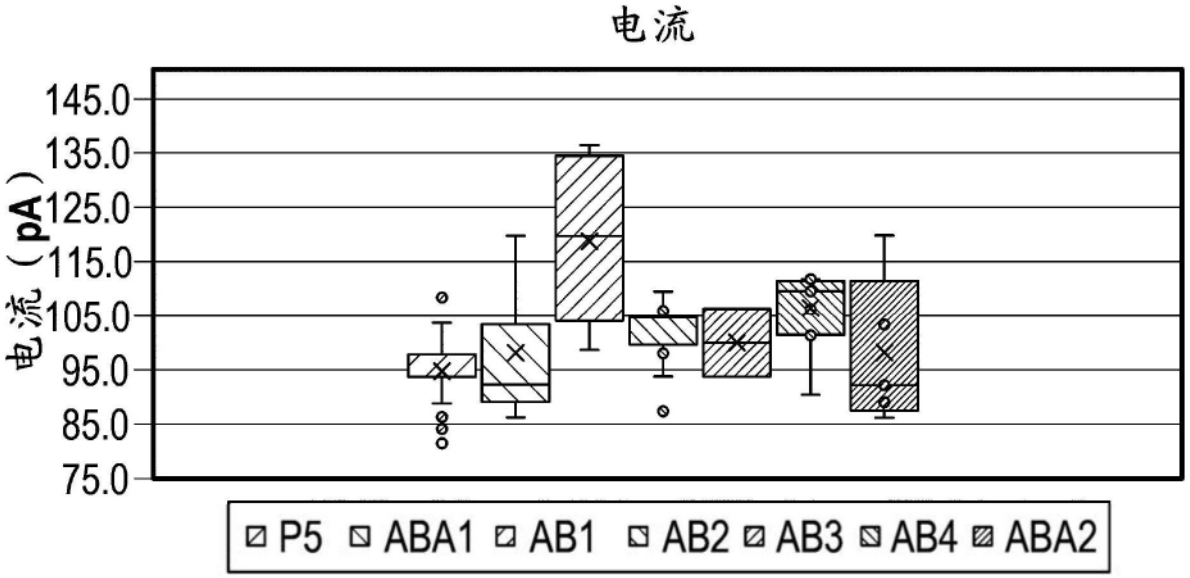

电流
电流（pA）
145.0
135.0
125.0
115.0
105.0
95.0
85.0
75.0
P5 ABA1 AB1 AB2 AB3 AB4 ABA2

图13

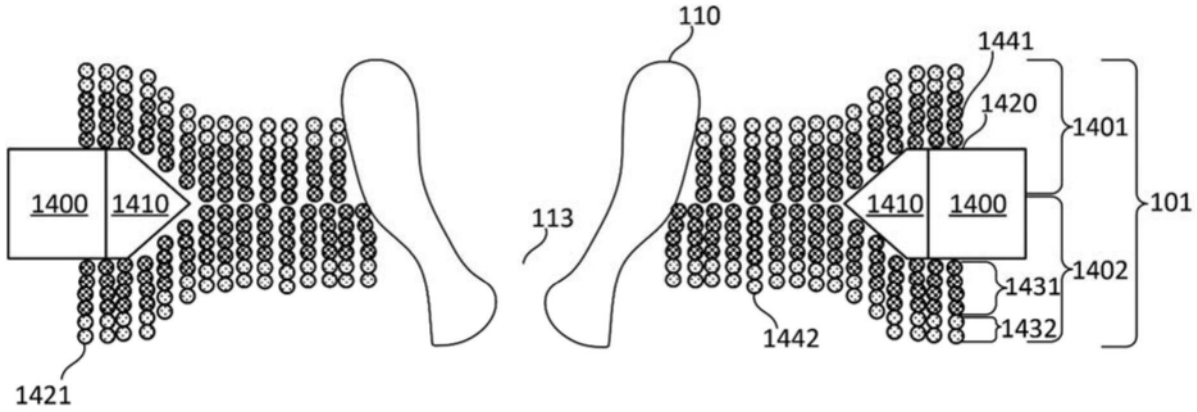


图14A

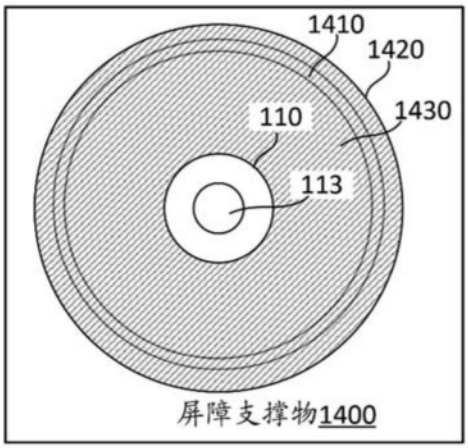


图14B

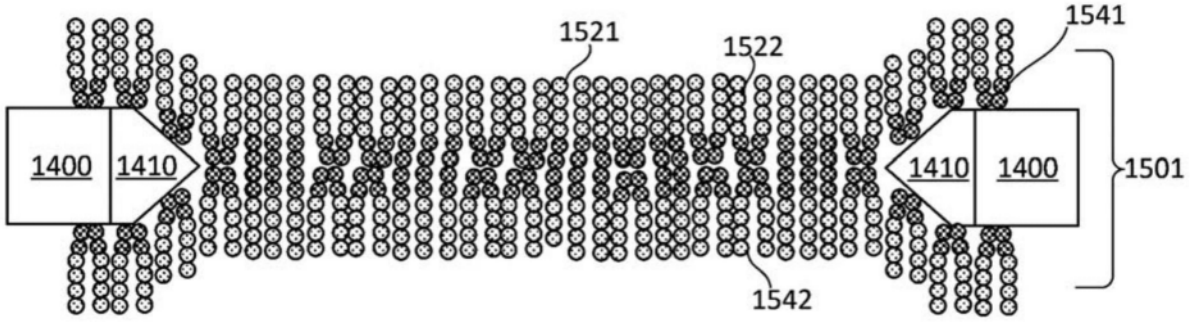


图15

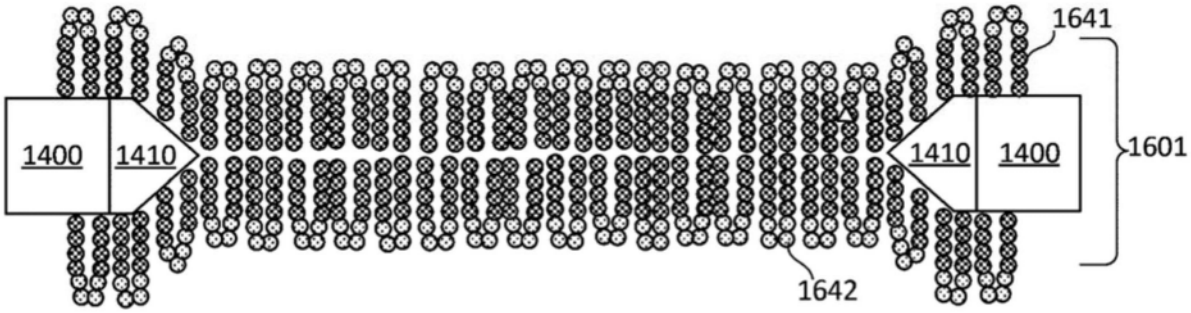


图16

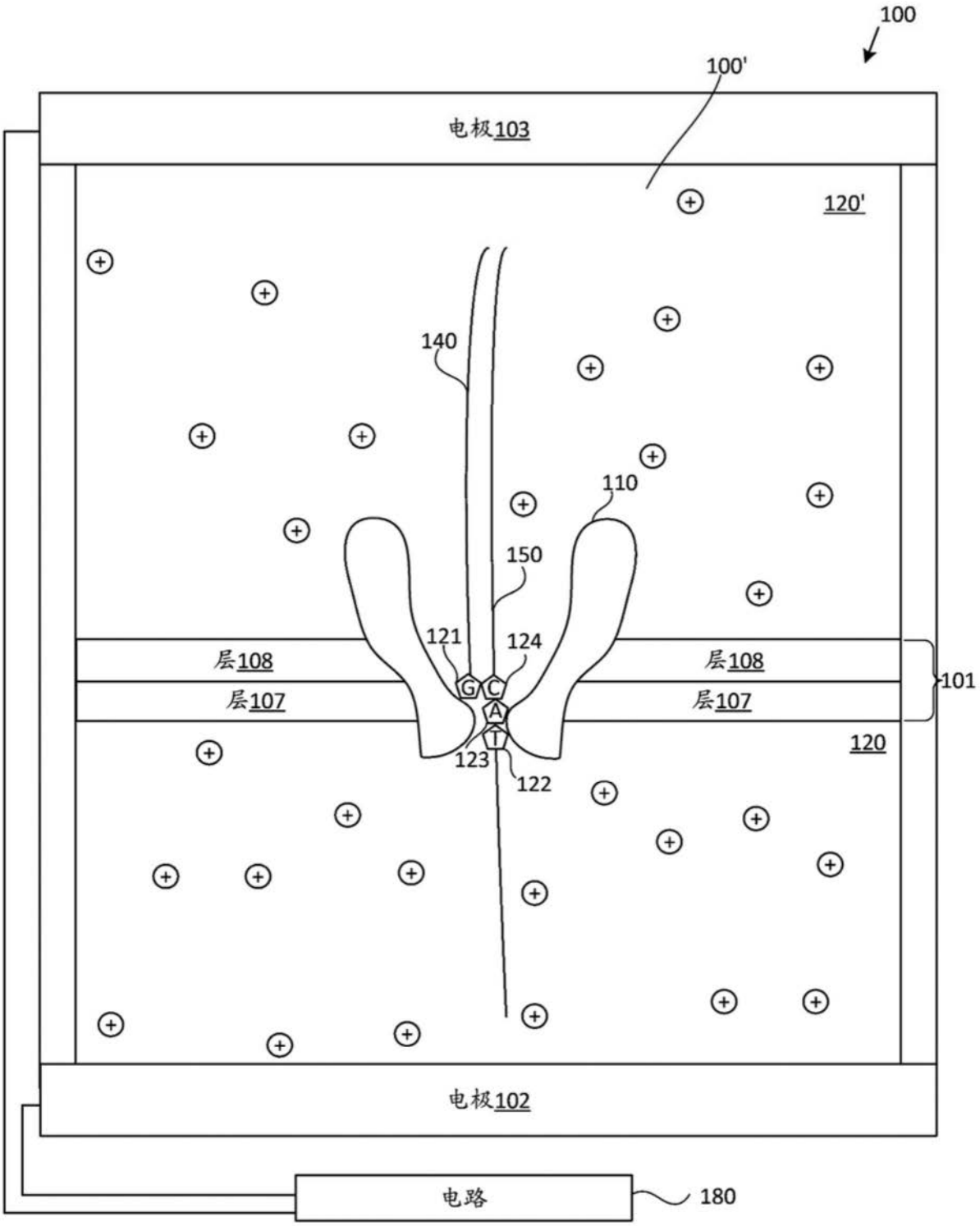

100
100'
电极103
120'
140
110
150
121
124
层108
层108
层107
层107
101
G
C
A
T
123
122
120
电极102
电路
180

图17