



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108700547 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680081221.3

玛丽娜·斯凡辛奈特斯基

(22)申请日 2016.12.08

(74)专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

(普通合伙) 31218

(30)优先权数据

代理人 翟羽

62/264,913 2015.12.09 US

62/264,944 2015.12.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2016/051320 2016.12.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/098518 EN 2017.06.15

(71)申请人 拉莫特特拉维夫大学有限公司

地址 以色列特拉维夫市

(72)发明人 费尔南多·帕托洛斯基

瓦迪姆·卡利夫斯基

(51)Int.Cl.

G01N 27/414(2006.01)

H01L 23/532(2006.01)

H01L 29/06(2006.01)

H01L 51/05(2006.01)

B82Y 15/00(2006.01)

C07C 51/04(2006.01)

C07C 50/16(2006.01)

C07C 50/18(2006.01)

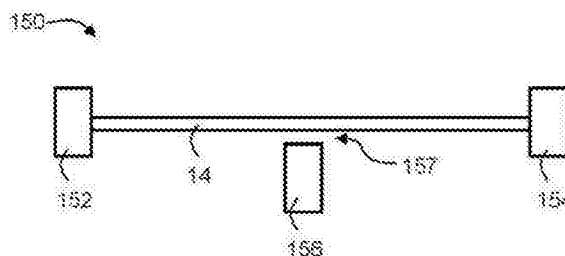
权利要求书2页 说明书55页 附图36页

(54)发明名称

用于传感的方法和系统

(57)摘要

一传感元件,包括一晶体管,所述晶体管具有一栅极、一源极、一栅极及一半导体纳米结构,所述半导体纳米结构连接在所述源极及栅极之间。所述半导体纳米结构被共价连接到其上的一官能基团所修饰。一电压源,连接到所述栅极。一控制器控制被所述电压源施加到所述栅极的一栅电压,以逆转当所述官能基团与一氧化还原反应剂接触时所发生的一氧化还原反应。



1. 一种用于检测电特性变化的系统,其特征在于:所述系统包括:
  - 一传感元件,包括一晶体管,所述晶体管具有一栅极及一半导体纳米结构,所述半导体纳米结构连接在一源极及一栅极之间,并且被共价连接到所述半导体纳米结构上的一官能基团所修饰;以及
  - 一电压源,连接到所述栅极;
  - 一控制器,被配置用以控制被所述电压源施加到所述栅极的一栅电压,以逆转当所述官能基团与一氧化还原反应剂接触时所发生的一氧化还原反应;以及
  - 一电路,配置用以检测所述纳米结构的一电特性的多个变化。
2. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述官能基团是一氧化还原反应性基团。
3. 如权利要求1及2任一项所述的系统,其特征在于:所述官能基团包含至少一官能基团,能够可逆地变化在所述至少一官能基团的多个原子的至少一者的一氧化数或氧化态。
4. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述官能基团包括醌。
5. 如权利要求2及3任一项所述的系统,其特征在于:所述官能基团包括醌。
6. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述官能基团包含芳族醌。
7. 如权利要求2至5任一项所述系统,其特征在于:所述官能基团包含芳族醌。
8. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述官能基团或包括一官能基选自于醌、苯醌、蒽醌及菲醌所组成的一群组,各者为取代的或未取代的。
9. 如权利要求2至7任一项所述的系统,其特征在于:所述官能基团或包括一官能基团选自于醌、苯醌、蒽醌及菲醌所组成的一群组,各者为取代的或未取代的。
10. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述电特性包括所述纳米结构的一表面上的电子或电荷密度。
11. 如权利要求2至9任一项所述的系统,其特征在于:所述电特性包括所述纳米结构的一表面上的电子或电荷密度。
12. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述纳米结构是一纳米线材。
13. 如权利要求2至11任一项所述的系统,其特征在于:所述纳米结构是一纳米线材。
14. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述半导体纳米结构包括硅。
15. 如权利要求2至13任一项所述的系统,其特征在于:所述半导体纳米结构包括硅。
16. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述传感元件包括:至少一额外的晶体管,具有一纳米结构由一非氧化还原活性基团所修饰,其中所述检测器电路配置用以从所述非氧化还原活性基团修饰的所述纳米结构所接收的多个信号中减去从所述氧化还原活性基团修饰的所述纳米结构所接收的多个信号。
17. 如权利要求2至15任一项所述的系统,其特征在于:所述传感元件包括:至少一额外的晶体管,具有一纳米结构由一非氧化还原活性基团所修饰,其中所述检测器电路配置用以从所述非氧化还原活性基团修饰的所述纳米结构所接收的多个信号中减去从所述氧化还原活性基团修饰的所述纳米结构所接收的多个信号。
18. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述系统被包含在一可附着于皮肤的贴纸中。
19. 如权利要求2至16任一项所述的系统,其特征在于:所述系统被包含在一可附着于皮肤的贴纸中。

20. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:所述系统被包含在一可植入一活体中的壳体中。

21. 如权利要求2至16任一项所述的系统,其特征在于:所述系统被包含在一可植入一活体中的壳体中。

22. 一种用于感知一生物体内代谢活动的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

使所述生物体与一传感元件接触,所述传感元件包括一晶体管,所述晶体管具有一栅极及一半导体纳米结构,所述半导体纳米结构连接在一源极及一栅极之间,并且被共价连接到所述半导体纳米结构上的一官能基团所修饰;

检测由在所述接触的期间发生的一氧化还原反应所导致的所述纳米结构的一电特性的多个变化;以及

对所述栅极施加一栅电压以逆转所述氧化还原反应。

23. 如权利要求22所述的方法,其特征在于:选择所述栅电压,以在所述纳米结构上维持所述官能基团的一大致恒定的群体。

24. 如权利要求1至23任一项所述的方法的系统,其特征在于:所述栅电压是恒定的。

25. 如权利要求1至23任一项所述的方法的系统,其特征在于:所述栅电压为约-3伏特至约+3伏特。

## 用于传感的方法和系统

### [0001] 相关申请案

[0002] 此案是一PCT申请案,其主张美国临时专利申请案第62/264,913号和第62/264,944号的优先权,两者皆于2015年12月9日提交申请,其内容通过引用的方式并入本文整体中。

### [0003] 技术领域和背景技术

[0004] 在本发明的一些实施例中,本发明涉及传感,并且更具体地但非排他地,涉及系统和方法,例如可以用于实时(real-time)同时(simultaneously)检测各种样品和/或用于实时检测氧化还原反应性基团,例如由代谢物产生的氧化基团。本文描述的系统和方法例如可用于监测和/或分析细胞的代谢活性,并因此用于各种诊断和/或治疗应用。

[0005] 代谢被定义为生物体中生成或消耗能量的总体生物化学过程。代谢过程调节细胞生长或死亡,改变其结构,并对其环境做出反应。异常的代谢反应会干扰正常的生理机能并导致严重的组织功能障碍,并且与许多疾病有关。

[0006] 癌症是具有代谢紊乱的常见人类疾病的一个例子。改变的细胞代谢是癌症的标志,有助于恶性转化以及肿瘤的起始、生长和维持。因此,例如研究表明改变的葡萄糖代谢促进癌症发展,并且癌细胞比正常组织消耗更多的葡萄糖并分泌更多的乳酸。

[0007] 因此认为,与癌症代谢相关的复杂网络以进行监测已被认定为是需要的,以区分癌症的代谢意义,估计治疗的有效性以及促进个人化的治疗。例如参见,Munoz-Pinedo等人所著的Cell Death Dis 2012,3:e248;and Griffin and Shockcor,Nature reviews Cancer 2004,4(7):551-561。

[0008] 迄今为止已使用几种方法来监测细胞的代谢活动。最普遍的是与分离方法相关的质谱(MS)技术,如气体(GC)或液体(LC)色谱。在质谱法中,物质基于它们的质荷比被电离和分离。质谱法在代谢物的生理浓度范围内是敏感的,但结果以终点方式获得,停止样品的代谢活动以收集数据,而不是实时(real-time)。此外,所述方法需要将样品预处理,使其无法相容于生物样品的直接测试,例如血液或血清等。用于质谱的替代分离方法,包括电喷雾电离(electrospray ionization,ESI),其可改善预处理,以及纳米结构-引发剂质谱法(nanostructure-initiator MS,NI-MS),其允许直接检测生理溶液。例如参见Shulaev V.所著的代谢组学技术和生物信息学Metabolomics technology and bioinformatics,生物信息简介Brief Bioinform 2006,7(2):128-139;and Northen et al.Nature 2007,449(7165):1033-U1033。

[0009] 对于在生理样品中使用多重分析的实时传感,已经寻求结合电化学和荧光传感技术的方法。已经开发了酶反应电化学传感器,其结合了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>检测电极和酶修饰膜,以将代谢物转化为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以用于实时传感[Pörtner R所著的动物细胞生物技术:方法和方案Animal cell biotechnology:methods and protocols,2nd edn.Humana Press:Totowa,NJ,2007]。还开发了具有嵌入荧光团(fluorophores)的荧光传感器,用于实时检测生物样品的O<sub>2</sub>消耗和pH变化[Marx V.于自然期刊Nature 2013,494(7435),p.131]。

[0010] W02012/137207描述了一种测量细胞代谢活性的方法,由于非挥发性可溶性代谢

产物、非挥发性可溶性代谢产物、挥发性可溶性代谢产物和挥发性可溶性代谢产物的分泌而产生的时间依赖性酸化特征,所述方法通过独立测量细胞的细胞外环境而实现,以及这种方法用于诊断和监测疾病治疗的用途。

[0011] 微流体技术和纳米技术的最新发展也被用于微量代谢物的超敏感实时检测。已经描述了微流体装置使用电泳[Garcia-Perez等人于色谱法期刊*Journal of Chromatography A*2008,1204(2):130-139;Garcia and Henry于分析化学期刊*Anal Chim Acta* 2004,508(1):Wang等人于分析化学期刊*Anal Chim Acta*2007,585(1):11-16;etal.*Analyst* 2009,134(3):486-492;以及Vlckova和Schwarz于色谱法期刊*J Chromatogr A* 2007,1142(2):214-221]或液相色谱法[Wang L等人于微电机制期刊*J Microelectromech S* 2008,17(2):318-327;Lin等人于分析化学期刊*Anal Chem* 2008,80(21):8045-8054]分离溶液中微量代谢物。然而,目前使用的微流体芯片需要与其他检测技术结合,因此需要预处理[Kraly等人于分析化学期刊*Anal Chim Acta* 2009,653(1):23-35]。

[0012] 还描述了用于检测靶代谢物的电化学、光化学和抗体/酶功能化的纳米线材传感器。例如参见Ramgir等人所著*Small* 2010,6(16):1705-1722;and Peretz-Soroka等人所著*Nano Lett* 2013,13(7):3157-3168。

[0013] 通过结合亲和力靶向代谢物的抗体/酶纳米线材FET装置例如已在以下的文献中公开,Lu等人于生物电化学期刊*Bioelectrochemistry* 2007,71(2):211-216;Patolsky所著的基于纳米线材的生物传感器*Nanowire-based biosensors*.分析化学期刊*Anal Chem* 2006,78(13):4260-4269;and Yang等人于纳米技术期刊*Nanotechnology* 2006,17(11):S276-S279。

[0014] 通过氧化反应检测代谢物的电化学敏感纳米线材传感器已在以下文献中公开,例如Lu等人于生物传感生物电子期刊中*Biosens Bioelectron*2009,25(1):218-223;Krivitsky等人于纳米文献期刊*Nano letters* 2012,12(9):4748-4756;Shao等人于先进功能物质期刊*Adv Funct Mater* 2005,15(9):1478-1482;Su等人于粒子与粒子系统特征期刊*Part Part Syst Char*2013,30(4):326-331;和Tyagi等人于分析化学期刊*Anal Chem* 2009,81(24):9979-9984。

[0015] 已知半导体纳米线材对吸附在其表面上的化学物质极其敏感。对于纳米线材装置,带电荷的分析物与纳米线材表面的结合可导致电导变化或流过线材的电流变化。一维纳米级形态和极高的表面与体积比使得基于纳米线材的传感器对于平面FET(field-effect transistors场效应晶体管)的电导变化更大,从而增加了对单一点的灵敏度,因此单分子检测是可能的。

[0016] 因此,基于纳米线材的场效应晶体管(nanowire-based field-effect transistors,NW-FET)在过去十年中被认为是用于检测化学和生物物种的强大潜在新型传感器。例如参见,Patolsky等人于分析化学期刊,*Analytical Chemistry* 78,4260-4269(2006);Stern等人于在电子装置的电子工程学会交易*IEEE Transactions on Electron Devices* 55,3119-3130(2008);Cui等人于科学期刊*Science* 293,1289-1292(2001);Patolsky等人于美国国家科学院院刊101,14017-14022(2004),均通过引用并入本文,如同在此完全阐述。

[0017] 还利用纳米线材电子装置进行了研究,用于同时多重检测医学诊断相关的多种生

物分子物种,例如DNA和蛋白质[Zheng等人于自然生物科技其刊中,Nature Biotechnology 23,1294-1301(2005);Timko等人于纳米文献期刊,Nano Lett.9,914-918(2009);Li等人于纳米文献期刊,Nano Lett.4,245-247(2004)]。

[0018] 通常,在NW-FET配置中,栅电压控制一给定源漏电压(source drain voltage, VSD)的沟道电导,并且栅电压(VGD)的调控改变了测量的源漏电流(source-drain current, ISD)。对于操作为场效应晶体管(FET)的纳米线材(NW)传感器,传感机制是纳米线材内带电分子在载流子上传导的场选通效应(field-gating effect)。与由微米尺寸材料或大型材料制成的装置相比,纳米器件的增强的灵敏度是与减小的尺寸和更大的表面/体积比密切相关。由于大多数生物分析物分子具有固有电荷,因此在纳米线材表面上的结合可以用作半导体硅纳米(SiNW)上的分子栅[Cui等人所著,2001,同上]。

[0019] 美国专利号No.7,619,290,具有公开号为2010/0022012的美国专利申请案和多个相应的申请案,教示了纳米级的装置,其由功能化纳米线材所组成,所述功能化纳米线材可以用作为传感器。

[0020] Clavaguera等人公开了一种使用化学功能化的硅纳米带状场效应晶体管(chemically functionalized silicon nanoribbon field-effect transistors)进行亚ppm检测神经药剂的方法[Clavaguera等人于应用化学期刊国际版Angew.Chem.Int.Ed.2010,49,1-5]。

[0021] 二氧化硅表面化学用于构建“纳米电子鼻”资料库,可通过回应的分布来区分丙酮和己烷蒸气[自然物质期刊Nature Materials Vol.6,2007,pp.379-384]。

[0022] 美国专利申请案具有公开号2010/0325073揭露了设计用于吸收气态NO的纳米装置。世界知识产权组织的专利公开号W02011/000443描述了利用功能化的纳米线材检测含硝化合物的纳米装置。

## 发明内容

[0023] 一种集成多路复用(multiplexing)和实时功能(real-time capabilities),直接检测生物样品和最低样品要求的传感方法是高度被需要的。这种系统可用于监测和分析细胞的代谢活动。这种方法应该使得检测不改变代谢物的产生,或扰乱相关物种的细胞外浓度。

[0024] 本发明人已经设计并成功地制备和实践了一种集成的微流体纳米结构传感系统,其包括一或多个传感隔室,其特征在于功能化的(例如氧化还原反应性)纳米结构场效应晶体管阵列,其与一或多个样品室流体连通。所述系统已被证明可以对生理溶液中的细胞代谢活动进行多重实时监测,并被证明是促进对个体医学的代谢网络和癌症条件的理解的一有效工具。

[0025] 根据本发明一些实施例的一方面,提供一种用于传感代谢活动的系统。所述系统包括:一传感元件,包括一晶体管,所述晶体管具有一栅极及一半导体纳米结构,所述半导体纳米结构连接在一源极及一栅极之间,并且被共价连接到所述半导体纳米结构上的一官能基团所修饰;以及一电压源,连接到所述栅极;一控制器,被配置用以控制被所述电压源施加到所述栅极的一栅电压,以逆转当所述官能基团与一氧化还原反应剂接触时所发生的一氧化还原反应;以及一电路,配置用以检测所述纳米结构的一电特性的多个变化。

- [0026] 根据本发明一些实施例,所述官能基团是一氧化还原反应性基团。
- [0027] 根据本发明一些实施例,所述传感元件包括:至少一额外的晶体管,具有一纳米结构由一非氧化还原活性基团所修饰,其中所述检测器电路配置用以从所述非氧化还原活性基团修饰的所述纳米结构所接收的多个信号中减去从所述氧化还原活性基团修饰的所述纳米结构所接收的多个信号。
- [0028] 根据本发明一些实施例,所述系统被包含在一可附着于皮肤的贴纸中。
- [0029] 根据本发明一些实施例,所述系统被包含在一可植入一活体中的壳体中。
- [0030] 根据本发明一些实施例的一方面,提供一种用于感知一生物体内代谢活动的方法。所述方法包括以下步骤:使所述生物体与一传感元件接触,所述传感元件包括一晶体管,所述晶体管具有一栅极及一半导体纳米结构,所述半导体纳米结构连接在一源极及一栅极之间,并且被共价连接到所述半导体纳米结构上的一官能基团所修饰;检测由在所述接触的期间发生的一氧化还原反应所导致的所述纳米结构的一电特性的多个变化;以及对所述栅极施加一栅电压以逆转所述氧化还原反应。
- [0031] 根据本发明一些实施例,选择所述栅电压,以在所述纳米结构上维持所述官能基团的一大致恒定的群体 (population)。
- [0032] 根据本发明一些实施例,所述栅电压是恒定的。
- [0033] 根据本发明一些实施例,所述栅电压为约-3伏特至约+3伏特。
- [0034] 根据本发明一些实施例的一方面,提供一种用于传感代谢活动的系统。所述系统包括:至少一腔室,与一传感隔室可控制地流体连通,所述至少一腔室配置用以容纳一流体,并且所述传感隔室包括一半导体纳米结构,以及一官能基团共价连接到所述纳米结构上,所述官能基团与一氧化还原反应剂接触时,所述纳米结构表现出一电特性的一可检测的变化。
- [0035] 根据本发明一些任何实施例,所述官能基团是一氧化还原反应性基团。
- [0036] 根据本发明一些任何实施例,所述官能基团包含至少一官能基团,能够可逆地变化在所述至少一官能基团的多个原子的至少一者的一氧化数或氧化态。
- [0037] 根据本发明一些任何实施例,所述官能基团包括醌 (quinone)。
- [0038] 根据本发明一些任何实施例,所述官能基团包含芳族醌 (aromatic quinone)。
- [0039] 根据本发明一些任何实施例,所述官能基团或包括一官能基选自于醌、苯醌、蒽醌及菲醌所组成的一群组,各者为取代的或未取代的。
- [0040] 根据本发明一些任何实施例,所述电特性包括所述纳米结构的一表面上的电子或电荷密度。
- [0041] 根据本发明一些任何实施例,所述纳米结构是一纳米线材。
- [0042] 根据本发明一些任何实施例,所述半导体纳米结构包括硅。
- [0043] 根据本发明一些任何实施例,所述系统还包括一检测器,所述检测器被构造和配置用以确定一电特性的变化。
- [0044] 根据本发明一些任何实施例,所述半导体纳米结构是一晶体管 (transistor)。
- [0045] 根据本发明一些任何实施例,所述系统包括多个所述纳米结构。
- [0046] 根据本发明一些任何实施例,所述多个纳米结构本值上是相同。
- [0047] 根据本发明一些任何实施例,所述多个纳米结构包括在所述相同的传感隔室中并

且始终在其中流体连通。

[0048] 根据本发明一些任何实施例,所述系统进一步包括一基板,在所述基板之上或之中沉积所述纳米结构并且/或者沉积所述多个纳米结构。

[0049] 根据本发明一些任何实施例,所述系统包括至少两个腔室,每个腔室配置用以容纳流体并且与所述传感隔室流体连通。

[0050] 根据本发明一些任何实施例,在所述至少两个腔室之间流体连通。

[0051] 根据本发明一些任何实施例,所述系统还包括一阀门,所述阀门配置用以控制每个腔室与传感隔室之间的流体连通以及/或者所述腔室之间的流体连通。

[0052] 根据本发明一些任何实施例,所述流体连通是通过多个微通道实现。

[0053] 根据本发明一些任何实施例,所述系统还包括至少一阀门,用于分别允许或阻止从所述至少一腔室到所述传感隔室的流动。

[0054] 根据本发明一些任何实施例,所述系统还包括一控制器,用于选择性地操作所述至少一阀门,以控制流体从所述至少一腔室到所述传感隔室的流动。

[0055] 根据本发明一些任何实施例,所述系统还包括一额外的传感装置。

[0056] 根据本发明一些任何实施例,所述传感装置包括一光学传感装置。

[0057] 根据本发明一些任何实施例,所述系统还包括一额外的腔室,所述额外的腔室没有半导体纳米结构,并且还与所述至少一腔室流体连通,其中所述额外的传感装置被配置用以从所述额外的腔室接收多个信号。

[0058] 根据本发明一些实施例的一方面,提供一种用于确定在至少一流体样品中一氧化还原反应剂的存在及/或量的方法,所述方法包括将至少一样品引入如本文所述的任一实施例中所述的传感系统,其中所述电特性的可检测的变化指示在所述至少一样品的各者中所述氧化还原反应剂的存在及/或量。

[0059] 根据本发明一些实施例的一方面,提供一种用于确定在至少一流体样品中产生一氧化还原反应剂的一物质的存在及/或量的方法,所述方法包括将至少一样品引入如本文所述的任一实施例中所述的传感系统,其中所述电特性的可检测的变化指示在所述至少一样品的各者中所述物质的存在及/或量。

[0060] 根据本发明一些任何实施例,所述方法进一步包括使至少一流体样品经历一反应条件,在所述反应条件下所述物质产生所述氧化还原反应剂。

[0061] 根据本发明一些任何实施例,所述经历包括使所述腔室与提供所述条件的腔室流体连通。

[0062] 根据本发明一些任何实施例,所述经历包括将提供所述条件的腔室与所述传感隔室流体连通。

[0063] 根据本发明一些任何实施例,所述条件包括一酵素反应(enzymatic reaction),催化由所述物质产生氧化剂或还原剂。

[0064] 根据本发明一些任何实施例,提供所述条件的腔室形成所述传感系统的一部分。

[0065] 根据本发明一些任何实施例,至少一流体样品包括一细胞,所述方法用于确定在至少一细胞中产生一氧化还原反应剂的一物质的存在及/或量。

[0066] 根据本发明一些任何实施例,所述物质是一代谢物。

[0067] 根据本发明一些任何实施例,至少一流体样品包括一细胞,所述方法用于确定或



监测细胞的代谢活性。

[0068] 根据本发明一些任何实施例,包括细胞的至少一流体样品,进一步包含一治疗剂,所述方法用于在接触所述治疗剂时确定或监测细胞的活性。

[0069] 根据本发明一些任何实施例,所述方法用于确定所述治疗剂对细胞的功效。

[0070] 根据本发明一些任何实施例,所述物质是一代谢物,所述方法用于鉴别能够改变细胞代谢活性的一试剂。

[0071] 根据本发明一些任何实施例,所述流体样品是一对象的一生物样品。

[0072] 根据本发明一些任何实施例,所述方法用于诊断与一对象中改变的代谢活动相关的一疾病。

[0073] 根据本发明一些任何实施例,所述方法用于监测与一对象中改变的代谢活动相关的一疾病。

[0074] 根据本发明一些任何实施例,所述氧化剂是一活性氧物质或是产生活性氧物质的一试剂。

[0075] 根据本发明一些任何实施例,所述氧化剂是一过氧化物。

[0076] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种传感系统,包括:

[0077] 一传感室,配置用以检测一靶分子;

[0078] 多个腔室,各腔室通过一相应的微通道和安装在其上的一相应阀门,与相同的传感隔室可控制地流体连通;以及

[0079] 一控制器,配置用以选择性地操作各阀门,以控制从所述至少两个腔室到所述传感隔室的流体流动。

[0080] 根据本发明一些任何实施例,所述发传感室包括一半导体纳米结构,所述半导体纳米结构配置用以使得在与一靶分子接触时,所述纳米结构表现出其一电特性的一可检测的变化。

[0081] 除非另有定义,否则所有本文使用的技术和/或科学术语与本发明所属领域的通常技术人员所理解的具有相同含义。尽管与本文所描述的类似或相同的方法或材料可以用于实践或测试本发明的实施例,但是仍将示例性的方法和/或材料描述如下。在冲突的情况下,以专利说明书所包含的定义为主。此外材料、方法和实施例仅是用于说明,而非旨在必然性地限制各自实施例。

[0082] 本发明实施例的方法和/或系统的实现可以涉及手动地或自动地执行或完成所选择的任务或其组合。此外,根据本发明实施例的方法和/或系统的实际仪器和设备,若干所选择的任务可以通过硬件、软件或固件或其组合使用一操作系统来实现。

[0083] 例如,根据本发明的实施例用于执行所选择的任务的硬件可以被实现为芯片或电路。至于软件,根据本发明的实施例所选择的任务可实施为多个软件指令,使用任何合适的作业系统通过一电脑执行。在本发明的一示例性实施例中,根据如本文所述的系统和/或方法的示范性实施例的一或多个任务通过一数据处理器执行,诸如用于执行多个指令的一计算平台。可选地,数据处理器包括用于存储指令和/或数据的一易失性存储器(volatile storage)和/或用于存储指令和/或数据的非易失性存储器(non-volatile storage),例如磁性硬盘和/或可移除的介质。任选地,设置一网络连接。可选地设置显示器和/或使用输入装置,诸如键盘或鼠标。

## 附图说明

[0084] 本发明的一些实施例,仅作为示例的方式,在本文中描述。现在详细具体地参照附图,其强调的是所述的细节是通过示例的方式、并出于本发明实施例的说明性讨论的目的而显示。在这点上,描述配合附图使本领域技术人员明了如何实施本发明的实施例。

[0085] 在图式中:

[0086] 图1A至图1D显示根据本发明一些实施例的示例性生物传感系统的图像(图1A至图1B)和示意图(图1C至图1D)。生物传感系统包括一培养隔室(culture compartment),其中可以容易地切换不同的样品,以用于多路复用传感(multiplex sensing),以及纳米线材场效应晶体管传感隔室(NW-FET sensing compartment,图1A-B)。在传感隔室中,用9,10-蒽醌-2-磺酰氯(9,10-anthraquinone-2-sulfochloride)进行修饰的硅纳米线材(SiNW)FET阵列作为一示例性氧化还原反应性基团(图1C)。由酵素氧化代谢物所产生的活性氧物质(reactive oxygen species,ROS)或随后的 $H_2O_2$ 将FET表面上的9,10-二羟基蒽(9,10-dihydroxyanthracene)氧化,以形成9,10-蒽醌,从而降低表面电子密度,然而还原剂N,N-二乙基羟胺(N,N-diethylhydroxylamine,DEHA)将9,10-蒽醌还原为9,10-二羟基蒽,从而增加表面电子密度(图1D)。(LOX:乳酸氧化酶;GOX:葡萄糖氧化酶;POX:丙酮酸氧化酶;Pi:无机磷酸盐)。

[0087] 图2A至图2D显示在氧化还原反应性硅纳米线材场效应晶体管(SiNWFET)的表面修饰和表征化期间,在XPS测量中所获得的数据。修饰方法:将9,10-蒽醌-2-磺酸钠(sodium 9,10-anthraquinone-2-sulfonate)的磺酸盐基团(sulfonate)转化为磺酰氯(sulfochloride,插图);用胺基对SiNW表面进行硅烷化(图2B);并形成磺酰胺(sulfonamide),其将9,10-蒽醌基团(9,10-anthraquinone group)连接至被修饰的表面(图2C)。呈现未修饰的SiNWFET(图2A)的碳(C)、氮(N)和硫(S)的修饰表面的XPS光谱和原子组成以及各个修饰步骤。图2D呈现了氧化的9,10-蒽醌修饰的硅纳米线材表面(蓝色曲线)和还原的9,10-二羟基蒽修饰的硅纳米线材表面(红色曲线)的XPS代表性测量光谱。从C1s曲线拟合计算C=O键的百分比。

[0088] 图3A至图3B显示在添加血清的基质中,回应于 $H_2O_2$ ,9,10-二羟基蒽修饰的SiNW FET的传感特性。图3A显示了9,10-二羟基蒽修饰的FET在不同浓度的 $H_2O_2$ 中的氧化动力学,以及与从被APDMES修饰的FET所获得的信号相比,通过还原剂溶液流过FET表面的还原动力学。(ΔIds:测量电流和基线之间的差异;I0:归一化因子; $V_g=0V$ ; $V_{ds}=0.2V$ ;在添加血清的基质中在pH7.4下进行传感)。在插图中给出了氧化和还原时相关官能基团的表面化学键群的比较。图3B显示了以 $H_2O_2$ 浓度和pH的函数建模的9,10-二羟基蒽所修饰的SiNW FET的传感回应(数据是平均值±标准偏差(SD), $n \geq 4$ 次重复)。

[0089] 图4A至图4C显示通过添加血清的基质中的氧化酶,9,10-二羟基蒽所修饰的SiNW FET回应于小分子代谢物乳酸盐(图4A)和葡萄糖(图4B)的传感特性,以及回应于PBS中的小分子代谢物丙酮酸盐(图4C)的传感特性。插图呈现相应的标准曲线。(LOX:乳酸氧化酶;GOX:葡萄糖氧化酶,POX:丙酮酸氧化酶; $V_g=0V$ , $V_{ds}=0.2V$ )。

[0090] 图5A至图5C呈现使用9,10-二羟基蒽修饰的NW FET,一补充还原剂的基质中的pH传感。图5A呈现通过一添加还原剂将修饰的FET转变为pH传感器一的示意图,其描绘了回应

于质子化或去质子化的表面质子密度的变化,其改变了被测量的电流。图2B显示在没有H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的一添加还原剂的基质中pH依赖性传感回应( $V_g = -0.3V$ ;  $V_{ds} = 0.2V$ )。图5C展示所述传感器在添加还原剂的基质中对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的不敏感性。通过流动一还原剂所获得的基础水平( $V_g = 0V$  (无还原剂),  $-0.3V$  (添加还原剂);  $V_{ds} = 0.2V$ )。注射700秒后获得信号;在添加血清的基质中于pH=8.00下进行传感。

[0091] 图6A至图6I呈现使用9,10-二羟基蒽修饰的NW FET,监测细胞代谢活性时所获得的数据。所测量的代谢物水平通过活细胞数量而被标准化。图6A和图6D分别显示被MTX处理的和被2DG处理的Jurkat细胞,在24小时监测期间所获得的数据。图6B和图6B显示被MTX处理的和被2DG处理的Jurkat细胞,于24小时后,活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)水平与所得细胞增殖速率之间的相关性。相对细胞计数是 $t = 24$ 小时的细胞计数与初始细胞计数的比率。图6F显示24小时后2DG处理的Jurkat细胞的乳酸水平与所得细胞增殖速率之间的相关性。对照实验的数据在图6A、图6B、图6D和图6E的所有插图中,通过使用二氯二氢荧光素(dichlorodihydrofluorescein)而获得。图6C和图6G分别显示MTX处理的和2DG处理的Jurkat细胞的pH值。CLL细胞的代谢量测水平通过正常B细胞的代谢量测水平而被标准化。数据是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM), $n \geq 3$ 次重复; $n = 6$ 个装置;利用学生t检验(Student's t-tests);\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$ )。图6H至图6I显示分别在24小时生存力观察中所获得的数据(MTX处理的和2DG处理的Jurkat细胞)。

[0092] 图7A至图7B显示慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemic, CLL)细胞和正常B细胞(图7A)的代谢水平及其生存力(图7B)。数据是平均值 $\pm$ 标准偏差(SD), $n = 6$ 个装置;利用学生t检验(Student's t-tests);\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$ );数据从原代人类B细胞24小时存活力观察所获得(CLL:慢性淋巴细胞白血病细胞;正常:正常B细胞)。

[0093] 图8呈现使用一全包式(all-inclusive)芯片实验室(lab-on-a-chip)于装有培养器的显微镜上,一示例性多重实时监测代谢物的示意图。芯片实验室从多细胞样品中分离靶细胞,并将被分离的靶细胞分配到中游细胞培养孔中。然后使代谢物反应以产生活性氧物质(reactive oxygen species, ROS),并将溶液转运至下游传感孔(LOX:乳酸氧化酶;GOX:葡萄糖氧化酶;POX:丙酮酸氧化酶;SOD:超氧化物歧化酶(superoxide dismutase);Pi:无机磷酸盐)。

[0094] 图9A和图9B是根据本发明的一些实施例中的一传感系统的多个示意图。

[0095] 图10是本发明实施例中一纳米结构的多个示意图,其中纳米结构形成一晶体管。

[0096] 图11A至图11C是根据本发明的一些实施例,包括两个或更多个传感隔室的系统的示意图。

[0097] 图12是根据本发明的一些实施例,电控传感器装置的暗视野显微镜图像。

[0098] 图13A至图13E是一过程的多个示意图,所述过程适合于根据本发明的一些实施例制造电控传感器装置,例如但不限于图12中所示的装置。

[0099] 图14A至图14C显示根据本发明的一些实施例的一修饰过程。

[0100] 图14D至图14F分别显示图14A至图14C所表示的各修饰阶段所获得的修饰表面的XPS光谱和原子组成。

[0101] 图15显示在氧化还原活性纳米线材装置上,通过栅极的电化学还原和通过还原剂的化学还原之间的比较,其为根据本发明的一些实施例所进行的实验期间而获得的。

[0102] 图16A和图16B示意性地显示非氧化还原活性和氧化还原活性基团所修饰的纳米线材装置之间的比较,其为根据本发明的一些实施例所进行的实验期间而获得的。

[0103] 图17A至图17B显示使用一示例性氧化还原活性修饰纳米线装置,传感磷酸盐缓冲盐水中的葡萄糖,其为根据本发明的一些实施例所进行的实验期间而操作的。

[0104] 图18显示模拟间质液(interstitial fluid)中连续葡萄糖监测的结果,其为根据本发明的一些实施例所进行的实验期间而获得的。

[0105] 图19A和图19B显示p型SiNW FET的电表征,其为根据本发明的一些实施例所进行的实验期间而获得的。

[0106] 图20A和图20B是SiNW的扫描电子显微镜(SEM)图像,其为根据本发明的一些实施例所进行的实验期间而获得的。

### 具体实施方式

[0107] 在本发明的一些实施例中,本发明涉及传感,并且更具体地但非排他地,涉及系统和方法,例如可以用于实时(real-time)同时(simultaneously)检测各种样品和/或用于实时检测氧化还原反应性基团,例如由代谢物产生的氧化基团。本文描述的系统和方法例如可用于监测和/或分析细胞的代谢活性,并因此用于各种诊断和/或治疗应用。

[0108] 在说明本发明的至少一种详细实施例之前,应当理解的是,本发明不只限于应用到下面的说明中所阐述的细节或通过实施例举例说明的细节。本发明能够实施成为其它的实施例或以各种方式被实践。另外也应理解,本文使用的措辞和术语是为了描述的目的,而不应被视为限制。

[0109] 本发明人已经设计并成功地制备和实践了一种集成的微流体纳米结构传感系统,其包括一或多个传感隔室,其特征在于功能化的(例如氧化还原反应性)纳米结构场效应晶体管阵列,其与一或多个样品室流体连通,已经成功利用所述系统对生理溶液中的细胞代谢活动进行多重实时监测。

[0110] 本发明人已经表明,使用这样的系统,可以进行各种样品的实时多路复用(real-time multiplex)监测,而无需预处理样品并且不干扰其基本特征和/或使用危险试剂。

[0111] 这样的系统可以用于各种诊断和治疗应用,例如诊断与代谢活动相关的疾病,在以下选择合适的(例如个人化的)治疗中,监测疾病治疗的功效,以及用于筛选用于改变细胞代谢活性的治疗剂的方法。

[0112] 如本文所述通本系统的多重实时监测避免了在分析之前预处理样品的需求,并且进一步地,在应当使用额外的一或多种试剂来产生待传感的基团的情况下,允许在所述系统内直接将这些试剂与被测试样品混和。这种直接混合允许使用少量(例如微量)的此试剂,并利用温和的条件和程序来产生待传感的基团,而导致待检测的基团最大化、改善传感可靠性和延长传感系统的寿命。

[0113] 另外,如本文所述的传感系统基本上减少了使用其他技术传感样品所需的时间,并且可以被设计为对于特定目标基团是非特异性的,使得可以针对各种样品同时实现多重传感。可以在将生物样品引入所述系统之前而不干扰生物样品的细胞和/或代谢过程而进行传感。

[0114] 传感系统:

[0115] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种系统,所述系统包括至少一腔室,所述腔室与所述传感隔室可控制地流体连通。

[0116] “可控制地流体连通”是指一流体路径,通过所述流体路径使用一流体控制装置允许或防止流体流动,所述流体控制装置例如但不限于阀门。在本发明的一些实施例中,可控制的流体连通包括一流体路径,流体的流速可以通过所述流体路径而变化。

[0117] 这里使用的术语“隔室(compartment)”应理解为描述一系统内的开放或封闭的外壳。所述隔室可以至少具有一底座和多个侧壁。否则隔室可以是一系统的一部分,通过其位置可与所述系统的其他部分分离。

[0118] 在一些实施例中,通过微通道(microchannels)实现流体连通。这种传感系统在本文中也称为微流体传感系统(microfluidic sensing system)。

[0119] 传感隔室(sensing compartment):

[0120] 现在参考附图9,其为根据本发明的一些实施例中一传感系统10的一示意图。

[0121] 系统10可包括具有一或多个半导体纳米结构14的传感隔室12。纳米结构14优选地是细长的。当采用多个(即两个或更多个)纳米结构14时,纳米结构14任选地并且优选地配置成阵列。例如,纳米结构可以大致彼此平行排列,如图9所示。

[0122] 如本文所用,“长形纳米结构(elongated nanostructure)”通常是指由一固体物质制成的一个三维体,并且延其长度的任何一点处具有至少一横截面尺寸,并且在一些实施例中,具有两个横截面尺寸。正交横截面尺寸小于1微米、或小于500纳米、或小于200纳米、或小于150纳米、或小于100纳米、或甚至小于70纳米、小于50纳米、小于20纳米、小于10纳米、或小于5纳米。在一些实施例中,横截面尺寸可小于2纳米或1纳米。

[0123] 在一些实施例中,所述纳米结构具有至少一横截面尺寸,范围为0.5纳米至200纳米,或1纳米至100纳米,或1纳米至50纳米。

[0124] 一纳米结构的长度表示其延伸程度,通常垂直于其横截面。根据本发明的一些实施例,所述纳米结构的长度范围为10纳米至50微米。

[0125] 长形半导体的横截面可以具有任何形状,包括但不限于圆形、方形、矩形、椭圆形和管形。包括规则和不规则的形状。

[0126] 在本发明的各种示例性实施方案中,所述纳米结构是一非中空结构,在本文中称为“纳米线材(nanowire)”。

[0127] “线材(wire)”是指具有导电性的任何材料,即具有使电荷通过其自身的能力。

[0128] 在一些实施例中,所述纳米线材的平均直径为0.5纳米至200纳米,或1纳米至100纳米,或1纳米至50纳米。

[0129] 在本发明的一些实施例中,所述纳米结构成形为一中空管,优选地沿其纵轴完全中空,在本文中称为“纳米管(nanotube)”或“纳米管状结构(nanotubular structure)”。

[0130] 所述纳米管可以是一单壁纳米管、多壁纳米管或其组合。

[0131] 在一些实施例中,所述纳米管的平均内径为0.5纳米至200纳米、或1纳米至100纳米、或1纳米至50纳米。

[0132] 在多壁纳米管的情况下,在一些实施例中,一壁间距离可以为0.5纳米至200纳米、或1纳米至100纳米、或1纳米至50纳米。

[0133] 考虑到本文所提供的有益地实施本发明实施例的指导,本领域一般技术人员将明

白并易于重现适于形成本文所述的纳米结构的多个半导体材料。例如,本发明实施例的纳米结构可以由第IV族元素的半导体制成,以及元素周期表第II、III、IV、V和VI族中任何一种、两种或多种元素的各种组合制成。

[0134] 如本文所用,术语“族(Group)”具有其通常的定义,如本领域普通技术人员所理解的。例如第III族元素包括硼(B)、铝(Al)、镓(Ga)、铟(In)和铊(Tl);第IV族元素包括碳(C)、硅(Si)、锗(Ge)、锡(Sn)和铅(Pb);第V族元素包括氮(N)、磷(P)、砷(As)、锑(Sb)和铋(Bi);和第VI族元素包括氧(O)、硫(S)、硒(Se)、碲(Te)和钋(Po)。

[0135] 在本发明的一些实施例中,所述纳米结构由掺杂有供体原子(donor element)的半导体材料所制成,称为“掺杂剂(dopant)”。本发明的实施例考量掺杂,以实现n型(比完成一晶格结构多的电子过量)和p型(比完成一晶格结构少的电子不足)掺杂。n型材料中的额外电子或留在p型材料中的空穴(电子的不足)分别用作为负电荷载流子(negative charge carriers)和正电荷载流子(positive charge carriers)。适合作为p型掺杂剂和n型掺杂剂的供体原子在本领域中是已知的。

[0136] 例如,所述纳米结构可以由掺杂有硼(B)(通常是乙硼烷(Diborane),但并非一定)、铝(Al)或镓(Ga)的硅所制成,以提供一p型半导体纳米结构,或具有磷(P)(通常是膦(phosphine),但并非一定)、砷(As)、锑(Sb)或提供一n型半导体纳米结构。

[0137] 在本发明人进行的实验中,已经使用了具有乙硼烷掺杂剂的Si纳米线材和p型Si纳米线材。

[0138] 在一些实施例中,所述传感隔室包括多个纳米线材和/或纳米管,例如通过使用化学气相沉积在一基板上生长。任选地,一旦获得纳米线材和/或纳米管,蚀刻所述基板(例如通过光刻法),并且根据需要将纳米线材和/或纳米管布置在所述传感隔室内。或者,可以使用激光辅助催化生长(laser assisted catalytic growth, LCG)制造纳米线材。用于形成半导体纳米结构和构建如本文所述的多个纳米结构阵列的任何方法都是可预期的。

[0139] 在一些实施例中,所述传感隔室包含多个纳米结构,例如每平方厘米2至2000个纳米结构。所述纳米结构可包括如本文所述的纳米线材,如本文所述的纳米管,以及其组合。

[0140] 示例性纳米管及其制备方法公开在W02010/052704之中,其通过引用并入本文,如同在本文中完全阐述一样。

[0141] 如下文进一步所详细描述,也可考虑任何其他半导体纳米结构。

[0142] 传感隔室12任选地且优选地包含共价连接至纳米结构14的官能基团16。选择官能基团16使得在与可检测的目标物质(例如基团或化合物)18接触时,纳米结构14表现出可检测的纳米结构14的电特性变化。。

[0143] 例如,纳米结构14可以在纳米结构14的一些区域上或在纳米结构14的整个长度上表现出电子或空穴密度的变化。纳米结构14可以额外地或替代地表现出其导电性或电阻率的变化。

[0144] 当采用多个纳米结构14时,所有纳米结构可以共价地连接到相同的官能基团,或者,至少两个纳米结构共价地连接到不同的官能基团。在相应的两个或更多个纳米结构上使用两个或更多个官能基团是有利的,因为其允许隔室12依次或同时传感多于一种类型的靶分子。

[0145] 以下提供适用于一些本发明实施例的官能基团。

[0146] 在如本文所述的传感隔室12的一些任何实施例中,当采用多个纳米结构14时,所述多个纳米结构包括在相同的传感隔室中并且始终在其中流体连通。

[0147] 在如本文所述的传感系统10的一些任何实施例中,采用多个纳米结构14,并且所述多个纳米结构包括在两个或更多个传感隔室中,并且在各传感隔室中,所述多个纳米结构始终在其中流体连通。下面描述系统10包括一个以上传感隔室的实施例。

[0148] 纳米结构14的性质的变化可以通过一检测器32来检测,检测器32经由通信线34与纳米结构14连接。当采用多个纳米结构时,各纳米结构优选地通过一单独的通信通道与检测器32连接。

[0149] 检测器32可以是允许检测半导体特性的任何类型。

[0150] 例如,检测器32可以构造成用于测量对应于电特性变化的电量测值。所述电量测值例如可以是电压(voltage)、电流(current)、电导率(conductivity)、电阻(resistance)、阻抗(impedance)、电感(inductance)、电荷(charge)等。

[0151] 所述检测器通常包括一电源和一电压表或电流表。在一实施例中,可以检测到小于1nS的电导。在一些实施例中,可以检测到数千纳秒(nS)范围内的电导。

[0152] 例如,当可检测物质18影响纳米结构14的电子或空穴密度的变化时,检测器32可以配置用以施加电压至纳米结构14并测量通过纳米结构14的电流。在本发明的一些实施例中,纳米结构14接触源极和漏极(未显示,参见图10)。在这些实施例中,检测器32可选地且优选地配置用以在源极和漏极之间施加一源-漏电压并测量所述源-漏电流的变化。在本发明的一些实施例中,纳米结构14与源极、漏极和栅极接触,使得纳米结构14形成一晶体管,例如但不限于一场效应晶体管(field effect transistor, FET)。在这些实施例中,检测器32可选地且优选地被配置在源极和漏极之间施加一源-漏电压,并且可选地还将栅电压施加到栅极,并测量所述源-漏电流的变化。源极

[0153] 图10是实施例中纳米结构14的一示意图,其中纳米结构14形成一晶体管150(例如FET)。晶体管50包括源极152、漏极154、栅极156其中纳米结构14用作沟道。栅极可选地,且优选地,但不是必须地通过一间隙157与纳米结构14间隔开。一栅电压可以通过栅极156施加到一沟道纳米结构14。在一些实施例中,当栅极156的电压为零,纳米结构14不含任何自由载流子,并且基本上是绝缘体。随着栅极电压增加,由此引起的电场从源极152和漏极154吸引电子(或更一般地为电荷载流子),并且纳米结构14变为导电的。在一些实施例中,不施加栅极电压,并且电荷载流子密度的变化仅通过纳米结构14和靶分子18之间的相互作用来实现。

[0154] 应理解,当纳米结构的电特性因应于与含有含硝基化合物的一样品的相互作用而变化时,可产生可检测的信号。例如,所述沟道的电特性的变化可引起晶体管对栅极电压回应的特性的变化(例如,源-漏电流,以栅极电压作为函数),可以检测和分析所述变化。

[0155] 本发明人还发现,施加到栅极的一栅极电压可用于逆转氧化还原转变,所述氧化还原转变是由所述纳米结构表面上的官能基团所表现出。本发明人还发现,栅极电压可用于控制可在所述纳米结构表面上被氧化基团的量。因此,在本发明的一些实施例中,选择施加到栅极的栅极电压,以在所述纳米结构的表面上保持一通常为恒定的,并且任选地且优选地为预定的官能基团的群体(population)。优选地,栅极电压是恒定的。一旦纳米结构与氧化剂(例如,ROS、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)接触,由栅极电压实现的平衡条件改变,因为氧化剂的存在降低了

官能基团的群体 (population) 水平。这种减少改变了所述纳米结构的电学性质 (例如导电性)。

[0156] 晶体管150可以以多种方式使用。在本发明的一些实施例中,所述晶体管150包含在系统10的隔室12中,在本发明的一些实施例中,晶体管150包含在一可附着于皮肤的贴纸中,用作为一可附着于皮肤的代谢活动装置 (例如持续监测葡萄糖),以及在本发明的一些实施例中,晶体管150可植入一活体中使用,以用作为一可植入的代谢活动装置。

[0157] 所述纳米结构14可以沉积在一基板28上,或者部分或完全浸没在基板28中。

[0158] 所述基板例如可以是一弹性体聚合物基板。合适的弹性体聚合物基板材料通常根据它们与制造过程 (软光刻,立体光刻和三维喷射印刷等) 的相容性以及由微流体系统所执行的特定操作中存在的条件来选择。这些条件可包括极端pH值、微通道内的压力、温度、离子浓度等。另外,还选择多种弹性体聚合物基板材料,因为所述材料对于系统进行的分析或合成的关键组分具有惰性。多种弹性聚合物基本材料也可以用合适的多种材料涂覆,如下面详细讨论的。

[0159] 在一些实施例中,所述弹性体聚合物基本材料优选是透明的。当系统10与光学或视觉检测装置一起使用时或包括光学或视觉检测装置时,这些实施例特别有用。或者,例如可以将玻璃或石英的透明窗口结合到系统中以用于这种类型的检测。弹性体聚合物可具有直链或支链骨架,并且可以是交联的或非交联的。

[0160] 由于聚合物化学、前体 (precursors)、合成方法,反应条件和潜在添加剂的巨大差异,存在大量可能的弹性体系统,其皆可被考量用于制造本实施例的微流体系统。

[0161] 弹性体聚合物的代表性实例包括但不限于聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane,PDMS)、聚异戊二烯 (polyisoprene)、聚丁二烯 (polybutadiene)、聚氯丁二烯 (polychloroprene)、聚异丁烯 (polyisobutylene)、聚(苯乙烯-丁二烯-苯乙烯) (poly(styrene-butadiene-styrene))、聚氨酯 (polyurethanes) 和硅氧烷 (silicones)。由于压电致动器的行程很小 (纳米范围),本发明人还考虑使用通常为非弹性的聚合物,条件是所形成的微通道的壁具有足够的弹性,如上文进一步详细描述。这种聚合物的代表性实例包括但不限于PMMA和聚碳酸酯 (polycarbonate)。

[0162] 样品隔室:

[0163] 系统10还可包括一或多个腔室20,其通过一通道22和安装在其上的阀门24与感应隔室12可控制地流体连通。当采用多个腔室时,每个腔室可选地通过相应的通道22和安装在其上的相应阀门24与相同的传感隔室12可控制地流体连通。在本发明的一些实施例中,采用两个或更多个传感隔室,例如传感隔室12,其中至少两个腔室与不同的传感隔室可控制地流体连通。在本发明的一些实施例中,在由不同腔室所馈送的传感隔室之间没有流体连通,并且在本发明的一些实施例中,在由不同腔室所馈送的传感隔室之间存在流体连通。在下文中提供了系统包括两个或更多个传感隔室的实施例的代表性示例。

[0164] 在本文所述的一些任何实施例中,当包括两个或更多个腔室时,两个或更多个腔室可以在其中流体连通 (除了与传感隔室流体连通之外)。

[0165] 如本文所用的术语“腔室 (chamber)”是指配置用以容纳流体 (例如,样品溶液、试剂溶液) 的封闭或开放的壳体。腔室20可以定位在微通道的表面上方 (例如如本文所述的基板28) 或微通道的表面内 (例如如本文所述的基板28)。如果采用多个腔室,则各腔室可以独



立地采用本文所述的任何配置。

[0166] 包含样品溶液的腔室在本文中可互换地称为样品腔室,并且包含试剂的腔室是可互换为在本文中所称的试剂腔室。

[0167] 在一些实施例中,本文所述的各腔室20独立地配置用以包含一定量的液体,其范围为微升至毫升。

[0168] 在一些实施例中,腔室呈孔洞(well)的形式。

[0169] 通道22优选为一微通道。

[0170] 本文所用的术语“微通道(microchannel)”是指具有横截面尺寸的流体通道,其最大尺寸小于1毫米、更优选小于500微米、更优选小于400微米、更优选小于300微米、更优选小于200微米、例如100微米或更小。

[0171] 隔室12、微通道22和腔室20都可以形成在一基板中,所述基板可以是与支撑纳米结构14(基板28)的相同基板,或者根据需要可以是不同的基板。

[0172] 通常但非必要地,微通道22接合同一平面。例如隔室12、微通道22和腔室20都可以在基板中形成,使得微通道22与基板上的相同平面接合。

[0173] 在一些实施例中,主通道26直接连接到腔室12,并且各微通道22在相应的腔室20和主通道26之间设置,使得对于腔室20中的至少一者,腔室到隔室12的流体路径包括相应的微通道22和主通道26。可选择地,但不是必须地,主通道26也是一微通道。在本发明的一些实施例中,主通道26的直径至少为1毫米。主通道26可以与微通道22接合相同的平面,但是在一些实施例中,主通道26的一部分在微通道22所接合的平面的上方或下方。

[0174] 在本发明的一些实施例中,系统10包括一额外的腔室21,其与传感隔室12以及两个或更多个腔室20流体连通,使得从腔室20到隔室12的流体路径穿过额外的腔室21。图9B中示意性地显示所述实施例。额外的腔室21例如可以用作为一反应或混合腔室,可以建立来自两个或更多个不同腔室20的物质流入至所述额外的腔室21。不同的物质可以在额外的腔室21中反应或混合,并且混合物和/或反应产物可以流入传感隔室12。额外的腔室21和传感隔室12之间的连通例如可以通过通道26。

[0175] (多个)腔室20和通道22一起形成系统的一部分,在本文中也可互换地称为“培养隔室”或“样品隔室”。

[0176] 微通道22可以通过本领域已知的任何技术形成在基板28中,包括但不限于软平版印刷(soft lithography)、热压印(hot embossing)、立体平版印刷(stereolithography)、三维喷射印刷(three-dimensional jet printing)、干法蚀刻(dry etching)和注射成型(injection molding)。

[0177] 在本发明的一些实施例中,传感隔室、微通道和腔室形成在同一基板上,并且在本发明的一些实施例中,传感隔室形成在与微通道和腔室不同的基板上。当使用多个不同的基板时,多个不同的基板可以某种程度上的连接或分离,以保持腔室和传感隔室之间的可控制的流体连通。例如通过将主通道26实施为从微通道22延伸到传感隔室12的柔性管,可以确保两个单独基板之间的可控制的流体连通。当传感隔室和腔室形成在同一基板上时,它们可以被设置在基板上呈任何几何关系。例如,在本发明的一些实施例中,传感隔室定位在与所有腔室分离的基板的一区域处,并且在本发明的一些实施例中,所述传感隔室可以是在中央的,而所述多个腔室被分配为至少部分地环绕所述传感隔室。

[0178] 系统10优选地包括一控制器30,其配置用以选择性地操作各阀门24,以控制流体从腔室20到隔室12的流动。为了清楚地呈现,图9中仅显示一条连通线路,在控制器30和多个阀门24的一者之间。然而,应当理解,在至少一些实施例中,在控制器30和各阀门24之间存在一分离的连通线路,以便允许控制器30独立地控制各阀门,并且可选地为独立地。控制器30可以包括,或是与一数据处理器(未显示)连接,数据处理器可以是一通用计算机或专用电路。控制器30优选地根据预定的传感方案(sensing protocol)自动地操作阀门24,所述传感方案可以存储在数据处理器的存储器中。例如,控制器可打开两个阀门以允许两种流体流入主通道26,其中流体可混合并任选地反应。在预定量的流体已经通过通道26之后,控制器30可以关闭阀门。或者,阀门可以保持在其打开状态以允许连续传感。从通道26,混合物和任选的反应产物可以流入隔室12。混合物或反应产物包括至少靶分子18。在隔室12中,靶分子18接触纳米结构14和官能基团16,以实现纳米结构14的特性的变化。可以通过一检测器32检测特性的变化。

[0179] 一旦检测完成,控制器30可以关闭阀门(如果它们仍保持打开)以停止将靶分子18馈送到隔室12中。此后,控制器可以打开另一阀门以允许来自腔室20之一的洗涤流体流动。任选并优选地,在与分子18接触之前,选择洗涤流体以将纳米结构14的特性恢复到所述状态或水平。

[0180] 在本发明的一些实施例中,隔室12包括出口36,流体可从出口36排出隔室12(例如在洗涤操作之后)。出口通道38可以连接到出口36,以便于从隔室12中移除流体。在流体从通道26流入隔室12期间,流体可以通过在隔室12中产生的过压,而流过出口36进入通道38。如本领域中已知的,通过在通道38中施加负压(例如使用泵,未显示),流体可替代地或额外地通过端口36流入通道38。

[0181] 根据一传感系统的一些实施例中,如本文所述的一样品隔室与一或多个传感系统结合使用,其中一或多个传感系统为如本文所述的包含纳米结构的传感系统,以及/或者一或多个传感系统为任何其他类型的传感系统。

[0182] 在本文所述的任何实施例中,系统10可包括一或多个腔室,所述腔室具有至少一允许光学检查的透明壁、基座或上盖。这种腔室可以是任何腔室20,或者它们可以是专用腔室。专用于光学检查的腔室的代表性实施例在图8中显示。具有本文所述信息的普通技术人员将知道如何在其他实施例中结合这种专用腔室(例如图1A、图9A、图9B、图11A、图11B和图11C所示的实施例)。

[0183] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种传感系统,包括配置用以检测靶分子的传感隔室,和如本文所述的样品隔室。

[0184] 在一些实施例中,所述样品隔室包括多个腔室,各腔室通过相应的通道(例如微通道)及安装在其上的相应阀门,与相同的传感隔室可控制地流体连通。

[0185] 在这些实施例的一些中,所述系统还包括一控制器,用于选择性地操作各阀门,以控制从多个腔室到传感隔室的流体流动。

[0186] 这种系统通过将多个样品引入系统来允许执行多路复用监测(multiplex monitoring),如下面进一步详细描述。

[0187] 微通道、腔室、阀门、基板和样品隔室的任何其他特征可以根据本文所述的任一实施例用于一样品隔室,并且可以是其任何组合。

[0188] 所述传感隔室可以包括任何结构或多个结构,其在接触靶分子时产生可检测的变化,并且可以根据本领域已知的方法相应地设计。

[0189] 在一些实施例中,所述传感隔室包含一半导体纳米结构,其配置用以使得在接触靶分子时,纳米结构表现出其电特性的可检测的变化,如本文所述。所述纳米结构可以通过在其表面产生或附着的官能基团,而被功能化或非功能化。

[0190] 本实施例的传感系统可用于许多应用,包括但不限于化学应用、遗传应用、生物化学应用、药物应用、生物医学应用、医学应用、放射学应用和环境应用。

[0191] 因此可以选择所述传感,使得一旦靶分子接触传感隔室就发生可检测的变化。

[0192] 对于医学应用,本实施例的传感系统适用于诊断和患者管理,如下文所述和举例说明的。对于环境应用,本实施例的传感系统适用于检测有害物质或条件,例如空气或水污染物、化学试剂、生物有机体或放射性条件。对于遗传和生物化学应用,本实施例的传感系统适用于称为“芯片实验室 (lab-on-chip)”的方法中测试和/或分析DNA,和其他宏观或更小的分子,或这些分子之间的反应。

[0193] 本实施例的传感系统也可用于单细胞的生化和生物物理研究领域。例如,所述传感系统可以隔离某种类型的细胞或一组细胞。

[0194] 本实施例的系统和方法可用于传感许多类型的流体介质中的靶分子的存在以及流体介质中存在的物体。所述物体可包括有机、无机、生物、聚合物或任何其他材料。例如流体介质可以包括血液产品,无论是全血或血液成分,在这种情况下,物体可以是红细胞、白细胞、血小板等。流体介质还可包含其他体液,包括但不限于唾液、脑脊髓液、尿液等。还考虑了各种缓冲液和溶液,例如但不限于核酸溶液、蛋白质溶液、肽溶液、抗体溶液等。还考虑了各种生物和化学试剂,例如但不限于氧化剂、还原剂、酶、受体配体 (receptorligand)、细胞外组分、代谢物、脂肪酸、类固醇等。

[0195] 流体介质中的物体可以包括其他材料,例如但不限于细胞、细菌、细胞胞器、血小板、大分子、囊泡 (vesicles)、微珠 (microbeads),覆盖有可溶性因子特异性的抗体,例如配体 (ligand)、受遮蔽的受体 (shaded receptor) 和含有脂肪组织或微生物的生物材料。由本实施例的系统和方法所操纵的物体也可以由合成的 (聚合的或非聚合的) 材料制成或包括合成的 (聚合的或非聚合的) 材料,例如胶乳 (latex)、硅聚酰胺 (silicon polyamide) 等。物体可以是光学可见的或透明的。物体也可以发光或与其他物体共轭,以便于检测。

[0196] 具有两个或更多传感隔室的一传感系统:

[0197] 图11A至图11C是根据本发明的一些实施例的系统200的示意图,系统200包括两或更多个传感隔室12。在本发明的一些实施例中,传感隔室形成在同一基板的不同区域上,并且在本发明的一些实施例中,传感隔室形成在不同的基板上。

[0198] 系统200的腔室,通道和传感隔室的结构和原理类似于系统10的腔室、通道和传感隔室的结构和原理。系统10中可选的特征在系统200中也是可选的。为了清楚地呈现,出现在图9A至图9B中的一些参考数字在图11A和图11B中省略。

[0199] 具有多于一传感隔室的优点在于,可以由同一系统同时或依序地执行多种传感定。在本发明的一些示例性实施例中,各传感隔室中的纳米结构被设计为传感不同类型的靶分子,并且在本发明的一些示例性实例中,两个或更多个传感隔室中的纳米结构被设计为传感相同的靶分子,但所述靶分子可任选地指示不同的物质或活性和/或衍生自不同的

样品。

[0200] 分别分析来自各隔室的信号可以分离地被分析,例如分别确定其中不同靶分子的存在、不存在或水平。来自两个或更多个隔室(例如所有隔室)的信号也可以共同分析,使得来自相应传感隔室的信号集合限定了所述靶分子或多个所述靶分子的特征。

[0201] 在图11A的图示中,各传感隔室12从多个腔室20被馈送,如上文关于系统10所进一步详细描述。因此,例如在这些实施例中,诸如系统10的若干系统可以形成在同一基板上,以形成系统200。。

[0202] 在图11B中,(通过控制相应的阀门24)可以建立从至少一腔室到两个或更多个传感隔室12的流体连通。这些实施例允许对相同的物质执行不同的传感定。

[0203] 图11C显示一种配置,其中各感应隔室12由不同的腔室20馈送。馈送相应的感应隔室12的腔室本身可以被另一腔室所馈送。直接馈送多个传感隔室12的腔室标记为20',直接供给腔室20'的腔室标记为20"。腔室20"例如可以容纳待分析的样品,并且腔室20'可以容纳被选择的流体,以提供产生或产生靶分子的条件。例如腔室20'可含有一生物和/或化学试剂。当相应的阀门打开时,样品从腔室20"流到腔室20',从而满足产生靶分子的条件,并且靶分子流到相应的传感隔室12中。

[0204] 更具体的示例(其不旨在限制)在图8中显示。现在参考图8,其显示在装有培养器的显微镜上使用全包式芯片实验室(all-inclusive lab-on-a-chip)对代谢物的示例性多重实时监测的示意图。芯片实验室从多细胞样品中分离靶细胞,并将分离的靶细胞分配到中游细胞培养孔洞中。然后使代谢物反应以产生活性氧物质(reactive oxygen species, ROS),并将溶液转运至下游传感孔洞(LOX:乳酸氧化酶(lactate oxidase);GOX:葡萄糖氧化酶(glucose oxidase);POX:丙酮酸氧化酶(pyruvate oxidase);SOD:超氧化物歧化酶(superoxide dismutase);Pi:无机磷酸盐(inorganic phosphate))。

[0205] 用于检测氧化还原反应剂的传感系统:

[0206] 在一或多个传感隔室内使用硅纳米线材(SiNW)场效应晶体管(FET)阵列的情况下举例说明了如本文所述的传感系统,其中至少一些硅纳米线材通过向其表面引入官能基团而被修饰,使得在接触含有氧化剂或还原剂的样品时,多个纳米线材表现出可检测的电特性的变化,所述电特性的变化指示产生还原剂或产生氧化剂的物质的存在和/或量,例如代谢物。官能基团例如可以是能够进行氧化还原反应的基团,优选地为可逆地,并且由于氧化或还原,纳米线材上的电子密度发生变化。

[0207] 更具体地,通过将氨基官能化的硅纳米线材(amino-functionalized silicon nanowires)与9,10-蒽醌-2-磺酰氯(9,10-anthraquinone-2-sulfochloride)反应,从而产生9,10-二羟基蒽修饰的硅纳米线材(9,10-dihydroxyanthracene-modified SiNW)(参见图1C)来举例说明本文所述的一系统。在一示例性分析中,在含有代谢物的溶液到达FET阵列之前,在培养隔室内,利用微流体与氧化酶混合,将含有小分子产生氢的代谢物(small-molecule hydrogen-producing metabolites)转化为过氧化物( $H_2O_2$ ),操作所述系统。然后将所得溶液引入FET阵列,并且所产生的过氧化物在FET表面上氧化9,10-二羟基蒽(9,10-dihydroxyanthracene)以形成9,10-蒽醌(9,10-anthraquinone)。所述氧化反应降低了表面电子密度,从而增加了流过p型SiNW FET的电流。在另一种测定中,将还原剂(例如DEHA)溶液引入所述传感隔室并将9,10-蒽醌还原成9,10-二羟基蒽以增加表面电子密度。因此,

表面电子密度通过氧化或还原而改变,并改变测量的电流。

[0208] 一系统如本文所述包含9,10-二羟基蒽修饰的场效应晶体管(FET)传感器阵列被成功地构建和表征(例如参见图1A、图1B和图2A至图2D)并且在没有预处理的生理溶液和/或培养基中显示成功执行传感过氧化物(参见图3)、产生过氧化物的代谢物(参见图4A至图4C)以及pH值(参见图5A至图5C),以及在生理浓度范围内进行浓度依赖性传感。还显示如本文所述的一示例性系统在监测代谢活动和随后的增殖速率的同时执行细胞传感(参见图6A至图6I)。还验证了人慢性淋巴细胞白血病的代谢意义(参见图7A至图7B和表1)。

[0209] 根据本发明的一些实施例中,一示例性系统集成至一氧化还原反应性纳米线材传感隔室和微流体网络,并且被证明在生理溶液中或可选的不进行预处理的生理溶液中,成功地进行细胞代谢活动的多重实时监测。通过示例性系统监测代谢活性也成功地用于验证癌症代谢和抗癌剂的药物机制。

[0210] 如下文实施例部分中所示,结果清楚地表明,例如通过检测各种产生ROS的代谢物(ROS-producing metabolites),可以成功地利用本文所述的生物传感方法来监测和/或分析各种代谢活性。这样的系统本身可以成功地被利用,或者作为全包式(all-inclusive)芯片实验室(all-inclusive lab-on-a-chip)的一部分,如本文所述并且例如在图8A至图8B中显示,在各种诊断和治疗应用中,例如从分离靶细胞到传感、促进高通量筛选(HTS)、以及在治疗期间检测代谢变化以监测治疗有效性和促进个性化治疗。

[0211] 根据如本文所述的传感系统的一些实施例的一方面,提供一种系统,其可用于检测一氧化剂或一还原剂或一产生氧化剂或还原剂的物质,并且一旦将这样的试剂引入系统或在系统中生成,就会产生一可检测的变化。

[0212] 根据此方面的一传感系统,包括至少一腔室,其与传感隔室可控制地流体连通。

[0213] 根据一些实施例中,所述腔室被配置用以包含一流体,并且如本文所述并在图9中显示。

[0214] 根据一些实施例中,所述传感系统如本文所述并在图9、图1A或图1B中独立显示。

[0215] 根据本文所述的一些任何实施例中,所述传感隔室包括一半导体纳米结构,如参考本文图9所述。

[0216] 根据本发明的一些任何实施例的一系统此方面中,通过附着于纳米结构的官能基团进行传感,并且选择所述官能基团,使得在接触氧化还原反应性物质时,所述纳米结构表现出一可检测的电特性的变化。

[0217] 如本文和本领域所用的短语“氧化还原反应性物质”描述可作为氧化剂或还原剂参与一或多个氧化还原反应(a redox reaction or reduction-oxidation reactions)的基团或化合物,并且能够改变另一种物质的一或多个原子的氧化值。全文皆使用所述短语来描述氧化剂和还原剂。

[0218] 在全文中,对于本文描述的所述多个方面的任一者,本文所描述的多个实施例的任一者,一“氧化剂”在本文中也可互换地称为“氧化试剂(oxidizing/oxidative agent)”、“氧化基团(oxidizing/oxidative moiety)”或“氧化物质(oxidizing/oxidative species)”描述能够提高另一物质的一或多个原子的氧化数的基团、物质或化合物。通常这种变化涉及质子从另一物质转化为氧化基团或化合物。

[0219] 在使用如本文所述的传感系统中,适合于被检测的示例性氧化剂,包括但不限于

活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS) 或由活性氧物质产生的化合物。

[0220] 如本文所用,并且在本领域中众所周知,活性氧物质包括含氧分子和/或离子,其中一氧原子为自由基形式(具有一不成对电子)或是易于产生多种物质的分子或离子,所述物质在单一态 (singlet state) 下具有一个氧自由基或氧。实例包括但不限于:臭氧、过氧化物、RO· 及 ROO·, 其中R是有机基团或氢。在水或任何其他质子溶剂存在下,活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS) 通常产生过氧化氢。因此根据本发明的一些实施例,过氧化氢或任何其它过氧化物是示例性氧化剂。

[0221] 在全文中,对于本文描述的所述多个方面的任一者,本文所描述的多个实施例的任一者,一“还原剂 (reductant)” 在本文中也可互换地称为“还原/还原试剂 (reducing/reductive agent)”、“还原/还原基团 (reducing/reductive moiety)” 或“还原/还原物质 (reducing/reductive species)” 描述能够降低另一物质的一或多个原子的氧化数的基团、物质或化合物。通常这种变化涉及质子从另一物质转化为还原基团或化合物。

[0222] 合适的还原剂例如包括在释放一或多个质子时形成稳定阴离子的基团或物质。示例性的此类试剂包括,例如含羟基的试剂 (hydroxyl-containing agents), 其在释放一或多个质子后形成稳定的烯醇化物阴离子 (enolate anion)。本文给出了含有胺氧化物基团 (amine-oxide group) 的化合物或基团 (moiety) 作为实例。给出N-烷基- (N-alkyl-) 或N,N-二烷基-羟基胺 (N,N-dialkyl-hydroxyl amines) (例如DMHA) 作为代表性实例。还考量了任何其他已知的还原剂。

[0223] 根据本发明的一些实施例,官能基团是一氧化还原反应性基团,其在与氧化还原反应剂接触时,发生其一或多个原子的氧化数的变化。

[0224] 优选地,官能基团可以容易地从还原态转变为氧化态,反之亦然,即特征在于其能量在低能障碍下其原子氧化数的变化。官能基团可以被认为特征在于其一或多个原子的氧化数的可逆变化,即一可逆的氧化还原变化或转化。例如通过循环伏安法,可以测定基团 (moiety or group) 的可逆的氧化还原变化。

[0225] 示例性官能基团具有一氧化还原电位,其范围为约-1.0至约1.0伏特、或-0.8至0.8伏特、或-0.6至0.6伏特或-0.5至0.5伏特、或-0.4至0.4伏特、或-0.3至0.3伏特、或-0.2至0.2伏特、或-0.1至0.1伏特,以及较低的电位和它们之间的任何值。

[0226] 官能基团可包含至少一能够经历可逆氧化还原变化的官能基团,如本文所述。

[0227] 在本文所述的一些任何实施例中,所述官能基团的长度小于2纳米、小于1.5纳米、甚至小于1纳米。这允许电荷转移复合物的形成发生在纳米结构表面附近,从而增强了装置的灵敏度。

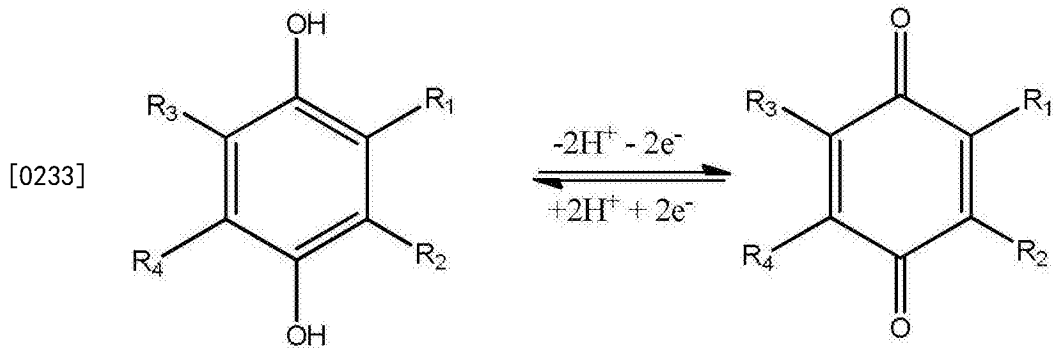
[0228] 在本文所述的一些任何实施例中,选择所述官能基团使得表现出至少100纳米、至少500纳米、至少800纳米和甚至1微米和更高的德拜长度 (Debye length)。

[0229] 如本文和本领域所使用的短语“德拜长度 (Debye length)” 是描述可以发生显著电荷分离的距离。

[0230] 一示例性官能基团包含至少一能够进行酮-烯醇互变异构化 (keto-enol) 的官能基团,所述术语是本领域熟知的。

[0231] 包含一或多个能够进行酮-烯醇互变异构化 (keto-enol) 的官能基团,例如包括一醌基团 (quinone moiety), 并且可以由以下示意式1共同表示:

[0232] 示意式1



[0234] 其中R1至R4各自独立地选自氢 (hydrogen)、烷基 (alkyl)、芳基 (aryl)、环烷基 (cycloalkyl)、卤素 (halo)、三卤代烷基 (trihaloalkyl)、烷氧基 (alkoxy)、羧基 (carboxy) 和任何其他化学相容的取代基,如本文所述,或者R1和R2和/或R3和R4一起形成一碳环 (carbocyclic ring),所述碳环可以是取代的或未取代的。

[0235] 碳环包括5元或6元芳族环 (aromatic ring) 或脂环族环 (alicyclic ring)。还考量如本文所定义的杂环 (Heterocyclic and heteroatomic rings)。

[0236] 优选地,R1和R2以及R3和R4中的一者或两者一起形成芳族环 (aromatic ring) (包括杂芳环 heteroaromatic ring),其可以是取代的或未取代的。这些基团在本文中称为芳族醌 (aromatic quinones),并且包括例如苯醌 (benzoquinone)、蒽醌 (anthraquinone)、菲醌 (phenanthrenequinone),各自是取代或未取代的,如本文所述。

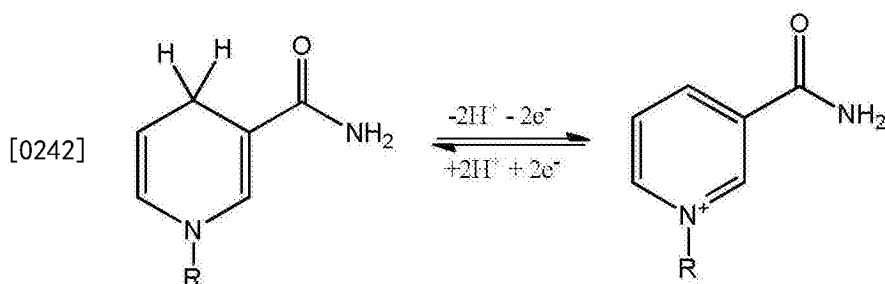
[0237] 在上面的示意式1中,左侧的基团(A)表示具有还原态原子(氧化数减少)的基团,右侧的基团(B)表示具有氧化数升高的原子的基团,并且此两种状态受质子转移影响,在本文中称为氧化还原变化或氧化还原转化 (redox change or redox transformation)。

[0238] 为了检测一氧化剂,示意式1左侧的基团A用于在纳米结构表面上产生一官能基团。在氧化剂存在下,这种基团经历电子离域 (electron delocalization) 和质子损失,并在示意式1的右侧产生基团B。

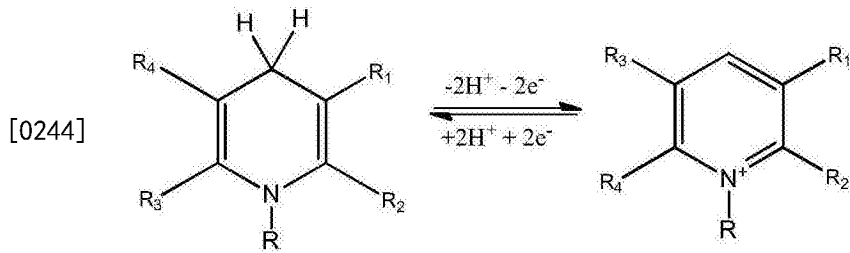
[0239] 为了检测一还原剂,使用右侧的基团。

[0240] 可包括在如本文所述的氧化还原反应性官能基团中的额外的示例性官能基团,包括但不限于NADH及其类似物,如以下示意式2至4中所示;FADH2及其类似物,如示意式5中所示;二茂铁 (ferrocene) 及其类似物、衍生物和其金属复合物,如示意式6中所示;卟啉有机金属复合物 (porphyrinogenic organometallic complexes),亚铁氰化物 (ferrocyanide) 及其类似物。

[0241] 示意式2:



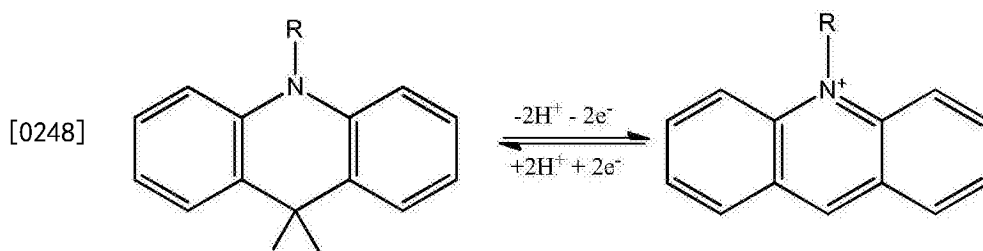
[0243] 示意式3:



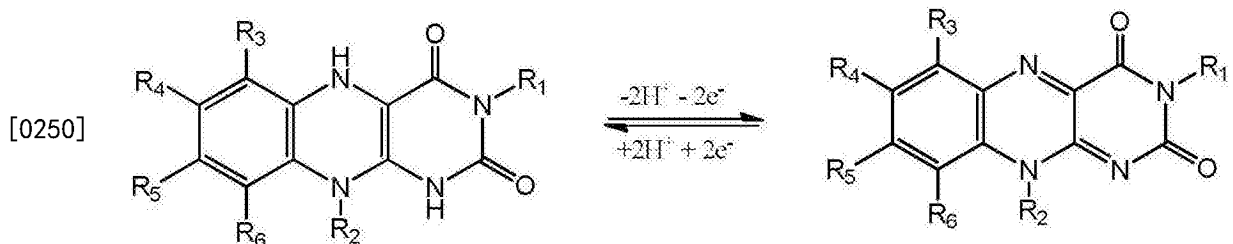
[0245] 其中R1至R4各自独立地选自氢 (hydrogen)、烷基 (alkyl)、芳基 (aryl)、环烷基 (cycloalkyl)、卤素 (halo)、三卤代烷基 (trihaloalkyl)、烷氧基 (alkoxy)、羧基 (carboxy) 和任何其他化学相容的取代基,如本文所述,或者R1和R 2和/或R 3和R4一起形成一碳环 (carbocyclic ring),所述碳环可以是取代的或未取代的。

[0246] 一示例性的此官能基团描述于以下方案4中被描述。

[0247] 示意式4:

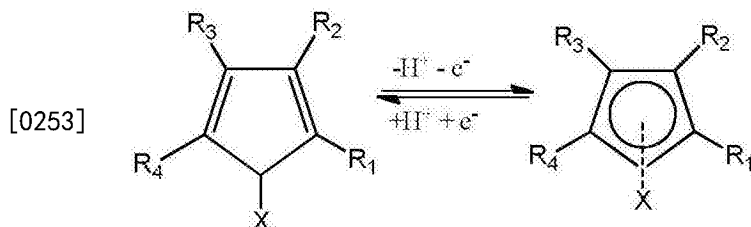


[0249] 示意式5:



[0251] 其中R1至R6各自独立地选自氢 (hydrogen)、烷基 (alkyl)、芳基 (aryl)、环烷基 (cycloalkyl)、卤素 (halo)、三卤代烷基 (trihaloalkyl)、烷氧基 (alkoxy)、羧基 (carboxy) 和任何其他化学相容的取代基,如本文所述,或者R2至R6中的两个或更多个一起形成一碳环 (carbocyclic ring),所述碳环可以是取代的或未取代的。

[0252] 示意式6:



[0254] 其中R1至R4各自独立地选自氢 (hydrogen)、烷基 (alkyl)、芳基 (aryl)、环烷基 (cycloalkyl)、卤素 (halo)、三卤代烷基 (trihaloalkyl)、烷氧基 (alkoxy)、羧基 (carboxy) 和任何其他化学相容的取代基,如本文所述,或者R1和R 2和/或R 3和R4一起形成一碳环 (carbocyclic ring),所述碳环可以是取代的或未取代的。

[0255] X是氢或优选为金属原子或离子,任选地进一步被额外的一或多个二茂铁



(ferrocene) 基团取代, 所述二茂铁基团可以为相同或不同。应注意, 如果存在多于一个二茂铁基团, 则氧化还原反应涉及对应于二茂铁基团数目的电子转移。

[0256] 示例性的非限制性卟啉有机金属复合物 (porphyrinogenic organometallic complexes) 包括卟啉 (porphyrin)、四甲基吡啶基卟啉 (tetramethylpyridilporphyrin) [5,10,15,20四(1甲基-4吡啶基)卟啉 (5,10,15,20-tetrakis(1methyl 4pyridinio porphine))] [TMPyP]; 四羟基苯基卟啉 (tetrahydroxyphenylporphyrine) [5,10,15,20二(4羟基苯基)卟啉 (5,10,15,20-tetrakis(4hydroxyphenyl) 21H,23H porphine)] [TP(OH)P]; 四苯基卟啉 (tetraphenylporphyrin) [5,10,15,20-四苯基-21H,23H卟啉 (5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H porphine)] [TPP]; 4,4',4'',4'''-(卟啉-5,10,15,20-四基)四(苯磺酸) (4,4',4'',4'''-(porphine-5,10,15,20-tetrayl) tetrakis (benzenesulfonic acid) [TBSP]; 血卟啉 (hematoporphyrin); 原卟啉IX (protoporphyrin IX)、叶绿素 (chlorophyll)、血红素 (heme) 和考琳 (corrin), 与过渡金属复合, 例如钴 [Co]、镍 [Ni]、铁 [Fe]、锌 [Zn] 和铜 [Cu]。还考量了其他金属、卟啉配体 (porphyrinogenic ligands) 及其任何组合。

[0257] 根据本文所述的一些任何实施例中, 对于用于检测氧化还原反应性基团的一传感系统, 氧化还原反应性基团是氧化剂, 并且官能基团处于还原状态, 使得在与氧化剂接触时, 其被氧化并且结果产生纳米结构的电性质的变化。

[0258] 在一些实施例中, 当官能基团被氧化剂氧化时, 纳米结构表面上的电子密度降低。当官能基团还原时, 纳米结构表面上的电子密度增加。

[0259] 在这方面参考图1D和示例1中的描述, 这些示例用于描述示例性的非限制性实施例, 其举例说明如本文在此方面所述的一传感系统的操作模式的一实施例。

[0260] 在本文所述的一些任何实施例中, 通过在官能基团内的反应性基团和纳米结构表面上的相容的反应性基团之间形成的共价键, 官能基团与纳米结构的表面共价地连接, 可为直接连接或通过一连接物。

[0261] 纳米结构表面上的反应基团是固有的或可以在合适的处理后产生。在一些实施例中, 当纳米结构是硅纳米线材 (SiNW) 或硅纳米管, 游离羟基 (free hydroxyl groups) 固有地存在于纳米结构的表面上并且可以用于将官能基团连接到其上。

[0262] 或者, 首先对本文所述的纳米结构进行表面修饰, 以产生表面反应性基团。这样的表面修饰例如可以通过将一双官能连接分子 (bifunctional linker molecular) 连接至纳米结构表面上固有的多个官能基团来进行, 所述双官能连接分子在其一个末端包含一反应性基团, 能够与这些固有的官能基团形成键结, 并且在另一个末端包含一反应性基团, 能够与本文所述的官能基团形成键结或其中的反应性基团形成键结。

[0263] 在本文所述的一些任何实施例中, 所述官能基团在连接到纳米结构之前包含一反应性基团, 其可以容易地与纳米结构表面上的反应性基团进行反应, 如本文所述, 以与纳米结构表面形成共价键。

[0264] 选择与所选纳米结构上的官能基团相容的一反应性基团是在本领域技术人员的能力范围内, 特别是鉴于本文提供的指导。

[0265] 在一些实施例中, 当纳米结构是硅纳米线材 (SiNW) 或硅纳米管时, 所述官能基团包含能够与纳米结构表面上的游离羟基形成共价键的一反应性基团。这种示例性的反应性

基团包括但不限于卤化物 (halides) 和醇盐 (alkoxides), 其可以作为离去的基团 (leaving groups) 以形成醚键 (ether bond)、羧酸 (carboxylic acids) 或酯 (esters), 其可以通过酯化 (esterification) 或酯交换 (trans esterification) 形成酯键, 以及卤代硅烷 (halosilanes) 和原硅酸盐 (orthosilicates, ), 其可形成-Si-O-键。

[0266] 根据本发明的一些实施例, 所述官能基团通过本文所述的任何一种键与纳米结构连接。

[0267] 在一些实施例中, 所述官能基团通过一双官能连接物 (bifunctional linker) 与纳米结构连接, 如本文所述。

[0268] 一示例性的这种连接物衍生自原硅酸盐 (orthosilicat), 其包含与Si连接的1、2或3个-OR基团, 用于与硅纳米结构表面上固有的羟基形成-Si-O-Si键, 以及1、2或3个烃基团 (例如烷基、亚烷基、环烷基、芳基) 终止于一反应性基团, 所述反应性基团能够与本文所述的官能基团的一反应性基团反应, 使得与Si原子连接的基团总数为4。

[0269] 在示例性实施例中, 所述连接物 (linker) 是原硅酸盐 (orthosilicat), 其包含一氨基烷基 (aminoalkyl)、一或多个烷基 (alkyl groups) 和一或多个与Si原子连接的烷氧基 (alkoxy groups)。在一实例中, 连接物衍生自 (3-氨基烷基)-原硅酸化的二甲基-乙氧基硅烷 ((3-aminoalkyl)-orthosilicatedimethyl-ethoxysilane, APDMES)。这种连接物在纳米结构的表面上产生反应性氨基。也考量了中止于其他反应性基团的类似原硅酸盐, 例如本文所述的反应性基团。

[0270] 如上所述, 所述官能基团可以通过一反应性基团连接到所述纳米结构上, 所述反应性基团与纳米结构表面上的反应性基团相容。如本文所述的官能基团衍生自具有如本文所述的氧化还原反应性的一化合物, 其进一步包含与其直接或间接 (例如通过一连接物) 连接的本文所述的反应性基团。

[0271] 对于本文示意式1、3、5和6中所示的化合物, 所述反应性基团可以是或形成R1至R4或R1至R6的任一者的一部份 (或作为取代基), 或由如本文所述的R1和R2和/或R3和R4, 或R1至R4或R2至R6所形成的碳环上的取代基。

[0272] 对于卟啉原复合物 (porphyrinogenic complexes), 反应性基团可以是卟啉型配体 (porphyrin-type ligand) 的取代基。

[0273] 在示例性实施例中, 所述官能基团通过一磺酰胺键 (sulfonamide bond) 与纳米结构连接, 所述磺酰胺键由磺酸盐 (sulfonate) 反应性基团和胺 (amine) 反应性基团形成。

[0274] 在示例性实施例中, 所述官能基团是如本文所述的醌 (quinone)、优选芳族醌 (aromatic quinone), 其包含一或多个含磺酸根的取代基。在示例性实施例中, 这种官能基团通过一磺酰胺键与具有胺基的修饰的纳米线材连接。

[0275] 如上所述, 作为含金属复合物的官能基团可以共价地连接到纳米结构上, 或者可选地或额外地, 非共价地吸附到纳米结构表面上。

[0276] 多构件系统:

[0277] 对于本文所述的任何一种传感系统及其实施例中的任一种, 所述传感系统可包括多个传感隔室, 所述传感隔室包括如本文所述的纳米结构, 其可以相同或不同的。

[0278] 在这些实施例中的一些中, 多个传感隔室中一者或多者或各者, 可以独立地为一传感隔室, 用于检测如本文所述和根据本文实施例中任一者所述的氧化还原反应剂或氧化

还原反应性物质。

[0279] 对于本文所述的任何一传感系统及其实施例中的任一者,除瞭如本文所述的基于纳米结构的传感隔室之外,传感系统还可以包括另外的传感隔室或装置。或者对于多个实施例,可选地描述其他传感隔室,而不是基于纳米结构的传感隔室。

[0280] 示例性传感装置或隔室例如包括光学传感装置或隔室。

[0281] 在本文描述的一些任何实施例中,对于一传感系统包括半导体纳米结构的传感隔室,所述系统可以包括额外的一或多个传感隔室,其没有半导体纳米结构,并且与样品隔室的一或多个腔室流体连通,其中所述额外的传感隔室或装置配置用以从所述额外的隔室接收信号。

[0282] 传感方法:

[0283] 根据本文所述的一些任何实施例的一方面,提供了一种检测靶分子的方法。

[0284] 如本文所述的任何一种传感系统可用于在引入含有靶分子的样品或产生靶分子的样品到所述样品隔室时检测靶分子。

[0285] “引入”包括放置、注射、孵育 (incubating)、流动 (flowing), 例如通过微通道等, 以及其任何组合。

[0286] 当传感系统在样品室隔中包括两个或更多个腔室时,可以将两个或更多个样品引入样品隔室,每个样品被引入不同的腔室。然后,通过控制每个腔室和传感隔室之间的流体连通,可以同时或顺序地对两个样品进行传感。

[0287] 可选地,当顺序地进行传感时,在顺序传感之间进行传感隔室的清洗。

[0288] 在一些实施例中,所述样品隔室还包括含有洗涤液(例如洗涤溶液)的一腔室,如下文进一步详细描述。

[0289] 如本文和本领域所用,“检测 (detecting)”包括确定靶分子的存在和/或量。

[0290] 如本文所用,术语“靶分子 (target molecular)”,其在本文中也可互换地称为“靶基团 (target moiety)”、“靶物质 (target species)”,一可检测基团或可检测物质,描述了一化合物、基团或物质,其与传感隔室接触并诱导一可检测的变化。

[0291] 设计所述方法中使用的传感隔室,使得当靶分子与其接触时发生可检测的变化,如本文所述。

[0292] 在根据此方面的一些实施例中,决定靶分子的存在和/或量可指示生产或产生靶分子的所述样品的组分的存在和/或量。

[0293] 在这些实施例中的一些中,靶分子的生产或产生是原位 (in situ) 进行的,即将所述引入的样品置于生产/产生靶分子的条件时。

[0294] 这些条件例如包括与样品或其组分反应的一试剂,以便直接或间接地产生靶分子。

[0295] 其他条件例如包括通过使样品与pH调节剂接触,来改变样品的pH。

[0296] 例如通过在样品隔室的一腔室中包含一试剂溶液,并允许包含样品的各腔室和包含试剂的所述传感隔室之间流体连通,可实现将所述引入的样品经受所述产生靶分子的条件。流体连通优选地同时从两个腔室进行,但也可以以短的时间间隔依序进行。

[0297] 或者,在两个腔室之间实现流体连通,可选地在额外的腔室中进行流体连通,然后实现与传感隔室的流体连通。

[0298] 在这些实施例中的任何一者中,提供产生靶分子条件的腔室形成所述传感系统的一部分。

[0299] 进一步可替代地,在实现腔室和传感隔室之间的流体连通之前,将试剂添加到样品被引入的同一腔室中。试剂和样品也可以一起引入同一腔室。

[0300] 在分析两个或更多个样品的可检测基团的情况下,每个样品可以独立地经受本文所述的条件。

[0301] 在本文所述的用于传感方法的任何实施例中,所用的传感系统用于检测氧化还原反应剂,如本文所述。

[0302] 根据如本文所述的检测方法的任一实施例的一方面,提供了一种决定一或多种流体样品中氧化还原反应剂的存在和/或量的方法。

[0303] 在此方面的一些实施例中,所述方法是通过在具有氧化还原反应剂的条件,将样品引入如本文所述的传感系统来实现。

[0304] 在本文所述的任何一实施例中,一旦将样品引入样品隔室中的腔室,或者一旦样品经受产生一氧化还原反应剂的条件,通过腔室与传感隔室之间的流体连通进行检测。

[0305] 如上所述,传感隔室在接触氧化还原反应剂时,形成所述传感隔室的纳米结构的电特性的一可检测变化被实现,并且指示一被测试样品中氧化还原反应剂的存在和/或量。

[0306] 所述方法可以通过将一或多个样品引入样品腔室和/或通过使这些样品中的一或多者经受产生氧化还原活性物质的条件来进行。

[0307] 在本文所述的任何一实施例中,所述方法用于决定在一或多个流体样品中产生氧化剂或还原剂的物质的存在和/或量,并且还可以包括使一或多个流体样品经受一反应条件,在所述反应条件下所述物质产生所述氧化还原反应剂。

[0308] 在这些实施例中的任何一者的一些示例性实施例中,所述物质产生所述氧化还原反应剂的所述反应条件,包括氧化或还原条件,并且在一些示例性实施例中,条件包括pH调节。

[0309] 例如这些条件可以通过合适的化学试剂或生物活化剂,例如酶(酵素)、受体配体、激素等来实现。

[0310] 在这些实施例的任何一者中,酶(酵素)中的试剂,例如氧化酶或还原酶,分别催化所述物质产生氧化剂或还原剂。

[0311] 在这些实施例的任何一者中,不同的反应条件(例如试剂)用于不同的样品,并且所述方法如本文所述,通过在将样品流体连通(在经受条件所述时)至传感隔室之前,将各样品经受其各自的条件而实现。

[0312] 在本文所述的任何一实施例中,氧化还原反应剂是氧化剂,如本文所述,例如ROS或由此产生的过氧化物。

[0313] 在这些实施例中,选择传感隔室中的官能基团,其能够与氧化剂相互作用,同时实现纳米结构的电特性的变化,如本文所述。

[0314] 在本文所述的任何实施例中,被测试样品包含如本文所述的氧化剂(例如 $H_2O_2$ )。

[0315] 在本文所述的任何一实施例中,被测试样品包含产生氧化剂的一物质,并且所述方法用于决定样品中所述物质的存在和/或量。

[0316] 在本文所述的任何一实施例中,所述物质是在合适条件下产生氧化剂的一代谢

物。

[0317] 几乎任何生物代谢物都可以经受诸如酶促反应或化学试剂的条件,在所述条件下其产生活性氧物质(reactive oxygen species,ROS)和随后的 $H_2O_2$ 。

[0318] 列举一些的非限制性示例包括:

[0319] 乳酸盐,在乳酸氧化酶催化的反应中产生 $H_2O_2$ ;

[0320] 葡萄糖,在葡萄糖氧化酶催化的反应中产生 $H_2O_2$ ;

[0321] 丙酮酸,在无机磷酸盐和氧气存在下产生 $H_2O_2$ ;

[0322] 次黄嘌呤(Hypoxanthine),在黄嘌呤氧化酶催化的反应中产生 $H_2O_2$ ;

[0323] NAD(P)H,在NAD(P)H氧化酶催化的反应中产生超氧化物;

[0324] 超氧化物( $O_2^-$ ),在超氧化物歧化酶催化的反应中产生 $H_2O_2$ 。

[0325] 醛(Aldehydes),在相应的醛氧化酶催化的反应中产生 $H_2O_2$ 。

[0326] 胆碱(Choline),在胆碱氧化酶催化的反应中产生 $H_2O_2$ 。

[0327] 类似地,一些代谢物在经受相应的酵素还原酶、脱氢酶或还原化学环境(例如,含 $H_2$ 的环境)时产生如本文所述的还原剂。本文考量了代谢物或任何其他物质(例如一生物物质)产生氧化剂或还原剂的任何其他条件。

[0328] 在检测|氧化还原反应性基团或|产生氧化还原反应性基团的物质的示例性一般方法中,将如本文所述的样品引入腔室中,所述腔室是样品隔室,任选地经受一或多种条件,例如培养条件、化学条件、治疗条件和/或产生氧化还原反应性基团的条件,然后与一传感隔室流体连通,用以检测一氧化还原反应剂,如根据本文所述的任何一实施例中,用以传感一氧化还原反应剂。

[0329] 在一示例性实施例中,将含有一氧化还原反应剂(例如过氧化氢)的溶液引入样品隔室的腔室中,然后与传感隔室流体连通,以用于氧化还原反应剂,如本文描述。由传感隔室所产生的信号指示代谢物的存在和/或量。

[0330] 在一示例性实施例中,将含有代谢物(任选的为生理溶液,例如生理基质)的溶液引入如本文所述的样品隔室中的一腔室(例如样品隔室)。将含有一条件的溶液(例如合适的氧化酶或化学试剂)引入样品隔室中的另一腔室(例如试剂腔室或条件腔室),在所述条件下代谢物产生氧化还原反应剂。两个腔室可选地通过流动到达第三腔室(例如测试腔室)而流体连通,然后第三腔室与传感隔室流体连通,如本文所述。由传感隔室产生的信号指示代谢物的存在和/或量。

[0331] 通过所述方法对各种浓度的各种代谢物所产生的的信号参考数据,可用于处理从更复杂的样品所获得的数据,从而监测和分析细胞的代谢活性,从而决定例如异常的代谢活动,或代谢活动的改进,如下文进一步所详细讨论的。

[0332] 在本文中,“条件”包括化学试剂、生物试剂、生物条件(例如培养基),加热、辐射、疗法(例如药物或任何其他处理,例如辐射)等。

[0333] 在一示例性实施例中,将细胞引入样品隔室中的一腔室,并经受培养条件。例如,储存在一样品隔室(例如第一试剂腔室)中的一腔室的培养基与含有细胞的腔室(例如样品腔室)流体连通。此后,任选地对培养的细胞进行存活力测定,以确定活细胞数和/或细胞增殖率。例如,腔室中的一部分培养细胞可以与另一腔室流体连通,其包括用于存活力测定或增殖率测定的条件。可替代地或另外地,培养的细胞的一部分可以经受另一种条件,例如治

疗或治疗剂(例如,药物或任何其他处理剂),并且在药物或处理剂的存在下培养(例如,第一试剂腔室)。另外,可以首先培养细胞,然后通过流入含有药物或处理的腔室(例如,第二试剂腔室)进行药物处理或其他处理。或者,细胞可以流到另一腔室,含有药物或处理剂的溶液可以被引入不同的腔室并流到与细胞相同的腔室(例如,一样品腔室)。

[0334] 作为治疗或治疗剂(例如药物或处理剂)的条件的替代方案,或其额外方案,细胞溶液(具有和/或不具有治疗)经受产生一氧化还原反应性基团的条件,如上文所述。例如,经受治疗的细胞流动(流体连通)到另一腔室(例如,测试腔室),并且条件溶液也流动(流体连通)到所述腔室。然后所述腔室与所述传感隔室流体连通。未进行治疗的完整细胞同样经受产生氧化还原反应剂的条件并与传感隔室流体连通。

[0335] 任选地,本文所述的各细胞样品在系统中流体连通到一传感隔室,所述系统包括如本文所述的多个传感隔室(参见例如图11C)。

[0336] 从上述各腔室所获得的传感数据指示细胞的代谢活动,任选地在经受诸如药物或其他处理剂的条件时。

[0337] 在本文所述的方法的任何一实施例中,在腔室与如本文所述的传感隔室流体连通之后,存在于样品隔室的一或多个腔室中的一或多种洗涤溶液是与传感隔室流体连通。在这些实施例的一些中,使用洗涤溶液以使官能基团“标准化”,即将官能基团中的氧化态改变为其原始氧化态。例如,使用洗涤溶液将已被一氧化性靶基团所氧化的官能基团转移至其还原态,或将已被一还原性靶基团所还原的官能基团转移至其氧化态。或者或另外,以含有pH调节剂的溶液用作洗涤溶液。

[0338] 或者,在本文所述的任何一方法步骤中,也可以进行pH传感,如下面的示例部分所示。

[0339] 示例:

[0340] 引入如本文所述的任何一传感系统的样品例如可以是含有靶基团的溶液或产生靶基团的物质,如本文所述。

[0341] 或者,样品为更复杂并且例如包括细胞、生物样品、包含细胞的生物样品,其各者可以进一步包含额外的试剂(agent、reagent)、培养基等,如上文概括性描述。

[0342] 在本文所述的任何实施例中,所述样品包含细胞,并且所述方法可用于决定在细胞中靶基团的存在和/或量(例如如本文所述的一氧化还原反应剂)或产生所述氧化还原反应剂的物质的存在和/或量。

[0343] 当所述物质是代谢物时,所述方法可用于决定、监测和/或分析细胞的代谢活动。

[0344] 如本文所用,“细胞”是指可以测量上述代谢活性的原核或真核细胞。细胞可以是细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞。根据具体实施例,细胞是人体细胞。应当理解,细胞可以指单个细胞,但也可以指多个细胞。细胞可以是分离的细胞(没有组织化的组织(tissue organization))或组织或组织片段中的细胞。根据具体实施例中,当细胞是PBMC时,在10<sup>3</sup>至10<sup>10</sup>个细胞上进行测定。根据具体实施例中,细胞数为10<sup>6</sup>至10<sup>7</sup>个。

[0345] 细胞可以是分化细胞、非分化细胞(例如干细胞)或去分化细胞。

[0346] 根据一实施例中,细胞是免疫系统的细胞,即白血球细胞(即white blood cell、leukocyte)。实例包括嗜中性粒细胞(neutrophil)、嗜酸性粒细胞(eosinophil)、嗜碱性粒细胞(basophil)、淋巴细胞(lymphocyte,T细胞或B细胞)、单核细胞(monocyte)、巨噬细胞

(macrophage) 和树突细胞 (dendritic cell)。

[0347] 根据另一实施例,细胞是任何组织(例如癌细胞)的致病性或患病的细胞。下面提供了根据本教示可以检测的其他疾病和医学病症。

[0348] 可根据本教示分析的其他细胞,包括但不限于胚胎细胞(例如用于IVF鉴别)、红细胞、血小板、细菌感染的细胞、真菌感染的细胞和病毒感染的细胞。

[0349] 因此,细胞可以指分离的细胞群,其包含特定细胞的高度纯化子集,即同源细胞群(例如>80%纯度),例如T细胞,或包含一异源细胞群,其包括各种类型免疫细胞,例如外周血白细胞(peripheral blood leukocytes,PBL)或单核细胞。

[0350] 细胞可以是非培养的、培养的原代细胞或克隆细胞(例如细胞系)。

[0351] 细胞可以是贴壁细胞或悬浮细胞。

[0352] 根据进一步的实施例,细胞可以是非遗传修饰的或遗传修饰的。

[0353] 根据本文所述的一些任何实施例中,可以将两个或更多个样品(其各自包含不同的细胞或细胞的不同溶液)同时引入系统(例如将各样品引入到样品隔室的不同腔室中)。任选地,引入不需要预处理样品。

[0354] 如本文所述,在进行传感之前,这些样品中的每一者都可以经受相同或不同的条件。

[0355] 任选地,使相同的样品经受不同的条件,并且在每次经受时进行传感。

[0356] 如本文所述的样品可以是细胞生物样品。

[0357] 示例性细胞生物样品包括但不限于血液(例如,外周血白细胞、外周血单核细胞、全血、脐带血)、实体组织活检、脑脊髓液、尿液、淋巴液、各种外分泌物、呼吸道、肠道、泌尿生殖道、滑液、羊水和绒毛膜绒毛。

[0358] 活检(biopsies)包括但不限于外科活检,包括切入活检或切除活检、微针抽吸等,完整的切除部分或体液。活组织检查的方法在本领域中是公知的。

[0359] 在引入系统后,本文所述任何一样品中的细胞可以在它们被引入的腔室内生长,或者在生理基质中,或存在额外的试剂(例如如本文所述的药物)下生长。

[0360] 应用:

[0361] 如上所述的传感方法可用于各种诊断和治疗应用中。

[0362] 在一些实施例中,包含细胞的至少一流体样品还包含治疗剂,并且本文所述的方法用于在接触治疗剂时决定或监测细胞的活性。

[0363] 这种方法可用于决定治疗剂对细胞的功效。

[0364] 在一些实施例中,所述物质是代谢物,并且所述方法用于监测细胞的代谢活性(metabolic activity,MA)。

[0365] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种监测细胞代谢活性的方法。所述方法通过将细胞引入如本文所述的任何一种传感系统来实现,任选地使细胞处于代谢物产生靶基团的条件下,并使靶基团与一传感隔室流体连通。

[0366] 在所述方面的一些实施例中,可以将细胞引入如本文所述的系统中培养,然后被培养的细胞的一部分可以与不同的腔室流体连通,并且各细胞可以经受一不同的条件,然后各条件的各腔室可以与一合适的传感隔室流体连通,如本文所述。

[0367] 在此方面的一些实施例中,传感隔室中的一或多者是用于检测氧化还原反应性基

团的传感隔室,并且细胞经受代谢物产生氧化还原反应性基团的条件,如本文所述。

[0368] 监测细胞代谢活性的方法例如可用于辨识能够改变细胞代谢活性的试剂,其中例如在本文所述的系统中被培养的细胞经受一条件,所述条件包括一被测试的试剂,然后如本文所述测定代谢活性。被培养的细胞可以在多个不同的腔室中同时经受不同的试剂,然后可以使这些腔室中的各者经受不同的其他条件,以决定一或多种代谢物的量和/或存在,如本文所述。

[0369] 使用如本文所述的任何实施例中的对象的如本文所述的生物样品作为流体样品,可用于诊断与对象的改变的代谢活性相关的疾病。

[0370] 或者,这种方法可用于监测与对向的改变的代谢活动相关的疾病的治疗。

[0371] 在一些实施例中,传感系统包括至少两个用于容纳流体样品的腔室,并且所述方法包括将至少两个样品引入所述传感系统,其中至少两个样品中的各者被引入至至少两个腔室中的各者,并且所述方法用于同时或依序地决定至少两个流体样品中物质的存在和/或量。在一示例性实施例中,两个样品包括多种细胞,一健康细胞和一患病的细胞,并且所述方法允许比较患病细胞的代谢活性的变化。在一示例性实施例中,两个样品包括患病的细胞,一个经受治疗条件(例如,药物或处理剂),一经受另一治疗条件或不经受任何条件,并且由于此治疗条件,所述方法允许比较患病的细胞的代谢活动的变化,因此表明被测试的治疗剂的治疗功效。

[0372] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种方法,用于在有此需要的对象中诊断与改变的代谢活动相关的疾病。所述方法通过将受试者的细胞样品(如本文所述的生物细胞样品)引入如本文所述的传感系统,并确定样品中一或多种代谢物的存在和/或量来实现,如本文所述。

[0373] 所述对象可以是经历常规健康检查的健康动物或人类对象。或者,所述对象可能有患有与改变的代谢活动相关的疾病的风险,例如癌症(例如,有遗传倾向的对象、具有医学和/或癌症家族史的对象,已经暴露于致癌物的对象、职业危害,环境危害)和/或表现出可疑的癌症临床症状的对象[例如,粪便或黑便中的血液、不明原因的疼痛、出汗、原因不明的发烧、不明原因的体重减轻直至厌食、排便习惯改变(便秘和/或腹泻),里急后重(tenesmus,排便不全,特别是直肠癌),贫血和/或全身无力]。

[0374] 如本文所用,术语“诊断(diagnosis)或(diagnosing)”是指确定病理学的存在或不存在(例如,疾病(disease)、病症(disorder)、病症(condition)或症状(syndrome)),对病理学或症状进行分类、决定病理学的严重性、监测病理学进展,预测病理结果和/或对于一对象的特定疾病的复原和筛检前景。

[0375] 如本文所用,“与改变的代谢活性相关的疾病”是指这样的疾病,其特征在于与从正常、健康(不受疾病影响)的相同细胞群相比,代谢活性发生变化的细胞群。已经经历代谢活动转变的细胞群可以是致病的细胞群(即,致病细胞,例如癌细胞)或非致病细胞群(例如,对抗疾病的细胞的疾病,例如免疫细胞,例如在实体肿瘤的情况下)。例如,在肿瘤学中,大多数癌细胞占主导地位以及经历克隆扩增的一些免疫系统群体,通过高速糖酵解产生能量,随后在胞质溶胶(cytosol)中产生乳酸,而不是通过相对低速的糖酵解,随后氧化线粒体中的丙酮酸而产生能量,与大多数正常细胞一样。

[0376] 根据一些实施例中,在相同细胞组成的正常、健康(未受影响)样品中的一或多种



代谢物水平(存在和/或量)在用于监测所述对象细胞的相同条件下测定。

[0377] 所述对象的细胞与对照细胞(正常未受影响)之间的代谢活动(一种或多种代谢物水平)的转变(即变化),如在相同条件下所获得的代谢物水平所证明的,表示与修饰的代谢活动谱相关的疾病。

[0378] 因此,例如通过本文所述的方法所获得的关于代谢物的数据,如乳酸盐的水平(量),任选地可与葡萄糖和/或丙酮酸水平的数据组合,可以与呈现在正常细胞中这些代谢物的一或多种水平的数据进行比较,以决定所述对象是否患有癌症。此外,根据生物细胞样品中这些代谢物中的一或多种的水平,可以将这些数据与其他数据进行比较,以更准确地确定癌症的类型和/或其起源和/或其阶段。

[0379] 代谢活性测定的结果可以受决策树模型的影响,所述模型对结果进行分类并有助于最终诊断。根据优选的实施例,结合至少两个模型(参见图9和10)。此类模型的示例包括但不限于CHAID、C5和C&R树型。可以进一步应用Logistic模型。

[0380] 根据本教示可以诊断和治疗的医学病症的实例(如下文进一步描述的)包括但不限于癌症、病原性感染和自身免疫疾病。以下提供具体实例。

[0381] 炎性疾病包括但不限于慢性炎性疾病和急性炎性疾病。

[0382] 与超敏反应(hypersensitivity)相关的超敏反应疾病的炎性疾病,例如但不限于I型超敏反应、II型超敏反应、III型超敏反应、IV型超敏反应、即时超敏反应、抗体介导的超敏反应、免疫复合物介导的超敏反应、T淋巴细胞介导的超敏反应和DTH。作为非限制性示例包括以下内容:

[0383] I型或即时超敏反应,如哮喘(asthma);

[0384] II型超敏反应,例如但不限于类风湿性疾病(rheumatoid diseases)、类风湿性自身免疫疾病(rheumatoid autoimmune diseases)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、脊椎炎(spondylitis)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis)、全身性疾病(systemic diseases)、系统性自身免疫疾病(systemic autoimmune diseases)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)、硬化症(sclerosis)、系统性硬化症(systemic sclerosis)、腺体疾病(glandular diseases)、腺体自身免疫疾病(glandular autoimmune diseases)、胰腺自身免疫性疾病(pancreatic autoimmune diseases)、糖尿病(diabetes)、I型糖尿病(Type I diabetes)、甲状腺疾病(thyroid diseases)、自身免疫性甲状腺疾病(autoimmune thyroid diseases)、格雷夫斯病(Graves' disease)、甲状腺炎(thyroiditis)、自发性自身免疫性甲状腺炎(spontaneous autoimmune thyroiditis)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、粘液性水肿(myxedema)、特发性粘液性水肿(idiopathic myxedema)、自身免疫性生殖疾病(autoimmune reproductive diseases)、卵巢疾病(ovarian diseases)、卵巢自身免疫(ovarian autoimmunity)、自身免疫性抗精子不育(autoimmune anti-sperm infertility)、反复胎儿丢失(repeated fetal loss)、神经退行性疾病(neurodegenerative diseases)、神经系统疾病(neurological diseases)、神经性自身免疫性疾病(neurological autoimmune diseases)、多发性硬化症(multiple sclerosis)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、重症肌无力(myasthenia gravis)、运动神经病(motor neuropathies)、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、神经病和自身免疫神经病(neuropathies and autoimmune neuropathies)、肌无力疾病

(myasthenic diseases)、Lambert-Eaton肌无力综合征(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)、副肿瘤性神经系统疾病(paraneoplastic neurological diseases)、小脑萎缩(cerebellar atrophy)、副肿瘤性小脑萎缩(paraneoplastic cerebellar atrophy)、非副肿瘤性僵硬综合征(non-paraneoplastic stiff man syndrome,)、小脑萎缩(cerebellar atrophies)、进行性小脑萎缩(progressive cerebellar atrophies)、脑炎(encephalitis)、Rasmussen氏脑炎(Rasmussen's encephalitis)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)、Sydeham式舞蹈病(Sydeham chorea)、Gilles de la Tourette综合征(Gilles de la Tourette syndrome)、多内分泌疾病(polyendocrinopathies)、自身免疫性多内分泌病(autoimmune polyendocrinopathies)、神经病(neuropathies)、神经病变性神经病(dysimmune neuropathies)、神经性肌强直(neuromyotonia)、获得性神经肌张力(acquired neuromyotonia)、先天性多发性关节炎(arthrogryposis multiplex congenita)、心血管疾病(cardiovascular diseases)、心血管自身免疫性疾病(cardiovascular autoimmune diseases)、动脉粥样硬化(atherosclerosis)、心肌梗塞(myocardial infarction)、血栓形成(thrombosis)、肉芽肿病(granulomatosis)、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、动脉炎(arteritis)、高安氏动脉炎和川崎综合征(Takayasu's arteritis and Kawasaki syndrome)、抗因子VIII自身免疫疾病(anti-factor VIII autoimmune disease)、血管炎(vasculitises)、坏死性小血管血管炎(necrotizing small vessel vasculitises)、显微镜下多血管炎(microscopic polyangiitis)、Churg和Strauss综合征(Churg and Strauss syndrome)、肾小球肾炎(glomerulonephritis)、pauci免疫性局灶性坏死性肾小球肾炎(pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis)、新月体性肾小球肾炎(crescentic glomerulonephritis)、抗磷脂综合征(antiphospholipid syndrome)、心力衰竭(heart failure)、激动剂样 $\beta$ -肾上腺素受体抗体在心力衰竭(agonist-like  $\beta$ -adrenoceptor antibodies in heart failure)、血小板减少性紫癜(thrombocytopenic purpura)、溶血性贫血(hemolytic anemia)、自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia)、胃肠道疾病(gastrointestinal diseases)、胃肠道自身免疫性疾病(autoimmune diseases of the gastrointestinal tract)、肠道疾病(intestinal diseases)、慢性炎症性肠病(chronic inflammatory intestinal disease)、乳糜泻(ceeliac disease)、肌肉组织自身免疫性疾病(autoimmune diseases of the musculature)、肌炎(myositis)、自身免疫性肌炎(autoimmune myositis)、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、平滑肌自身免疫性疾病(smooth muscle autoimmune disease)、肝病(hepatic diseases)、肝脏自身免疫性疾病(hepatic autoimmune diseases)、自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis)和原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis)。

[0385] IV型或T细胞介导的超敏反应包括但不限于类风湿性疾病(rheumatoid diseases,)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、全身性疾病(systemic diseases)、系统性自身免疫性疾病(systemic autoimmune diseases)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)、腺体疾病(glandular diseases)、腺体自身免疫疾病(glandular autoimmune diseases)、胰腺疾病(pancreatic diseases)、胰腺自身免疫疾

病 (pancreatic autoimmune diseases)、1型糖尿病 (Type 1 diabetes)、甲状腺疾病 (thyroid diseases)、自身免疫性甲状腺疾病 (autoimmune thyroid diseases)、格雷夫斯病 (Graves' disease)、卵巢疾病 (ovarian diseases)、前列腺炎 (ovarian diseases)、自身免疫性前列腺炎 (autoimmune prostatitis)、多腺体综合征 (polyglandular syndrome)、自身免疫性多腺体综合征 (autoimmune polyglandular syndrome)、I型自身免疫性多腺体综合征 (Type I autoimmune polyglandular syndrome)、神经系统疾病 (neurological diseases)、自身免疫性神经疾病 (autoimmune neurological diseases)、多发性硬化症 (multiple sclerosis)、神经炎 (neuritis)、视神经炎 (optic neuritis)、重症肌无力 (myasthenia gravis)、僵硬综合征 (stiff-man syndrome)、心血管疾病 (cardiovascular diseases)、心脏自身免疫性南美锥虫病 (cardiac autoimmunity in Chagas' disease)、自身免疫性血小板减少性紫癜 (autoimmune thrombocytopenic purpura)、抗辅助性T淋巴细胞自身免疫 (anti-helper T lymphocyte autoimmunity)、溶血性贫血 (hemolytic anemia)、肝病 (hepatic diseases)、肝脏自身免疫性疾病 (hepatic autoimmune diseases)、肝炎 (hepatitis)、慢性活动性肝炎 (chronic active hepatitis)、胆汁性肝硬化 (biliary cirrhosis)、原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis)、肾病 (nephric diseases)、肾性自身免疫性疾病 (nephric autoimmune diseases)、肾炎 (nephritis)、间质性肾炎 (interstitial nephritis)、结缔组织病 (connective tissue diseases)、耳疾病 (ear diseases)、自身免疫结缔组织病 (autoimmune connective tissue diseases)、自身免疫性耳病 (autoimmune ear disease)、内耳疾病 (disease of the inner ear)、皮肤病 (skin diseases)、皮肤病 (cutaneous diseases)、皮肤病 (dermal diseases)、大疱性皮肤病 (bullous skin diseases)、寻常型天疱疮 (pemphigus vulgaris)、大疱性类天疱疮 (bullous pemphigoid) 和天疱疮 (pemphigus foliaceus)。

[0386] 迟发型超敏反应的实例包括但不限于接触性皮炎 (dermatitis) 和药疹 (drug eruption)。

[0387] T淋巴细胞介导的超敏反应的类型的实例包括但不限于辅助性T淋巴细胞和细胞毒性T淋巴细胞。

[0388] 辅助性T淋巴细胞介导的超敏反应的实例包括但不限于Th1淋巴细胞介导的超敏反应和Th2淋巴细胞介导的超敏反应。

[0389] 自身免疫疾病 (autoimmune diseases)、例如但不限于心血管疾病 (cardiovascular diseases)、类风湿疾病 (rheumatoid diseases)、腺病 (glandular diseases)、胃肠疾病 (gastrointestinal diseases)、皮肤疾病 (cutaneous diseases)、肝病 (hepatic diseases)、神经疾病 (neurological diseases)、肌肉疾病 (muscular diseases)、肾病 (nephric diseases)、与生殖、结缔组织病和全身性疾病有关的疾病。

[0390] 自身免疫性心血管疾病的实例包括但不限于动脉粥样硬化 (atherosclerosis)、心肌梗塞 (myocardial infarction)、血栓形成 (thrombosis)、韦格纳肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)、Takayasu氏动脉炎 (Takayasu's arteritis)、川崎综合征 (Kawasaki syndrome)、抗因子VIII自身免疫疾病 (anti-factor VIII autoimmune disease)、坏死性小血管炎 (necrotizing small vessel vasculitis)、显微镜下多血管炎 (microscopic polyangiitis)、Churg和Strauss综合征 (Churg and Strauss syndrome)、pauci-免疫灶性

坏死性和新月体性肾小球肾炎 (pauci-immune focal necrotizing and crescentic glomerulonephritis)、抗磷脂综合征 (antiphospholipid syndrome)、抗体诱导的心力衰竭 (antibody-induced heart failure)、血小板减少性紫癜 (thrombocytopenic purpura)、自身免疫性溶血性贫血 (autoimmune hemolytic anemia)、心脏自身免疫性南美锥虫病 (cardiac autoimmunity in Chagas' disease) 和抗辅助性T淋巴细胞自身免疫 (anti-helperT lymphocyte autoimmunity)。

[0391] 自身免疫性类风湿病 (utoimmune rheumatoid diseases) 的实例包括但不限于类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis) 和强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis)。

[0392] 自身免疫性腺病 (autoimmune glandular diseases) 的实例包括但不限于胰腺疾病 (pancreatic disease)、I型糖尿病 (Type I diabetes)、甲状腺疾病 (thyroid disease)、格雷夫斯病 (Graves' disease)、甲状腺炎 (thyroiditis)、自发性自身免疫性甲状腺炎 (spontaneous autoimmune thyroiditis)、桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、特发性粘液性水肿 (idiopathic myxedema)、卵巢自身免疫 (ovarian autoimmunity)、自身免疫性抗精子不育 (autoimmune anti-sperm infertility)、自身免疫性前列腺炎 (autoimmune prostatitis) 和I型自身免疫性多腺体综合征 (Type I autoimmune polyglandular syndrome)。疾病包括但不限于胰腺自身免疫性疾病 (autoimmune diseases of the pancreas)、I型糖尿病 (Type I diabetes)、自身免疫性甲状腺疾病 (autoimmune thyroid diseases)、格雷夫斯病 (Graves' disease)、自发性自身免疫性甲状腺炎 (spontaneous autoimmune thyroiditis)、桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、特发性粘液性水肿 (idiopathic myxedema)、卵巢自身免疫 (ovarian autoimmunity)、自身免疫性抗精子不育 (autoimmune anti-sperm infertility)、自身免疫性前列腺炎 (autoimmune prostatitis) 和I型自身免疫性多腺体综合征 (Type I autoimmune polyglandular syndrome)。

[0393] 自身免疫性胃肠疾病 (autoimmune gastrointestinal diseases) 的实例包括但不限于慢性炎症性肠病 (chronic inflammatory intestinal diseases)、乳糜泻 (celiac disease)、结肠炎 (colitis)、回肠炎 (ileitis) 和克罗恩病 (Crohn's disease)。

[0394] 自身免疫性皮肤病 (autoimmune cutaneous diseases) 的实例包括但不限于自身免疫性大疱性皮肤病 (autoimmune bullous skin diseases)、例如但不限于寻常型天疱疮 (pemphigus vulgaris)、大疱性类天疱疮 (bullous pemphigoid) 和落叶性天疱疮 (pemphigus foliaceus)。

[0395] 自身免疫性肝病 (autoimmune hepatic diseases) 的实例包括但不限于肝炎 (hepatitis)、自身免疫性慢性活动性肝炎 (autoimmune chronic active hepatitis)、原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis) 和自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis)。

[0396] 自身免疫性神经疾病的实例包括但不限于多发性硬化症 (multiple sclerosis)、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)、重症肌无力 (myasthenia gravis)、神经病 (neuropathies)、运动神经病 (motor neuropathies)、格林-巴利综合征 (Guillain-Barre syndrome) 和自身免疫性神经病 (autoimmune neuropathies)、肌无力 (myasthenia)、兰伯特-伊顿肌无力综合征 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome)、副肿瘤性神经系统疾病

(paraneoplastic neurological diseases)、小脑萎缩(cerebellar atrophy)、副肿瘤性小脑萎缩(paraneoplastic cerebellar atrophy)和僵硬综合征(stiff-man syndrome)、非副肿瘤性僵硬综合征(non-paraneoplastic stiff man syndrome)、进行性小脑萎缩(progressive cerebellar atrophies)、脑炎(encephalitis)、Rasmussen氏脑炎(Rasmussen's encephalitis)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)、Sydeham舞蹈病(Sydeham chorea)、Gilles de la Tourette综合征(Gilles de la Tourette syndrome)和自身免疫性多内分泌病(autoimmune polyendocrinopathies)、免疫性神经病(dysimmune neuropathies)、获得性神经性肌强直(acquired neuromyotonia)、关节病多发性先天性(arthrogryposis multiplex congenita)、神经炎(neuritis)、视神经炎(optic neuritis)和神经退行性疾病(neurodegenerative diseases)。

[0397] 自身免疫性肌肉疾病的实例包括但不限于肌炎(myositis)、自身免疫性肌炎(autoimmune myositis)、原发性干燥综合征(primary Sjogren's syndrome)和平滑肌自身免疫疾病(smooth muscle autoimmune disease)。

[0398] 自身免疫性肾病(autoimmune nephric diseases)的实例包括但不限于肾炎(nephritis)和自身免疫性间质性肾炎(autoimmune interstitial nephritis)。

[0399] 与生殖有关的自身免疫疾病的实例包括但不限于重复的胎儿丢失(repeated fetal loss)。

[0400] 自身免疫结缔组织疾病的实例包括但不限于耳疾病(ear diseases)、自身免疫性耳疾病(autoimmune ear diseases)和内耳的自身免疫疾病(autoimmune diseases of the inner ear)。

[0401] 自身免疫性全身性疾病的实例包括但不限于全身性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)和全身性硬化症(systemic sclerosis)。

[0402] 传染病例如但不限于慢性传染病(chronic infectious diseases)、亚急性传染病(subacute infectious diseases)、急性传染病(acute infectious diseases)、病毒性疾病(viral diseases)、细菌性疾病(bacterial diseases)、原生动物疾病(protozoan diseases)、寄生虫病(parasitic diseases)、真菌病(fungal diseases)、支原体病(mycoplasma diseases)和朊病毒病(prion diseases)。

[0403] 移植物排斥疾病(graft rejection diseases)包括与移植物的移植相关的疾病,例如但不限于移植物排斥(graft rejection)、慢性移植物排斥(chronic graft rejection)、亚急性移植物排斥(subacute graft rejection)、超急性移植物排斥(hyperacute graft rejection)、急性移植物排斥(acute graft rejection)和移植物抗宿主病(graft versus host disease)。

[0404] 过敏性疾病(Allergic diseases)包括但不限于哮喘(asthma)、荨麻疹(hives)、荨麻疹(urticaria)、花粉过敏(pollen allergy)、尘螨过敏(dust mite allergy)、毒液过敏(venom allergy)、化妆品过敏(cosmetics allergy)、乳胶过敏(latex allergy)、化学过敏(chemical allergy)、药物过敏(drug allergy)、昆虫叮咬过敏(insect bite allergy)、动物皮屑过敏(animal dander allergy)、刺痛植物过敏(stinging plant allergy)、毒常春藤过敏(poison ivy allergy)和食物过敏。

[0405] 根据具体实施例,所述疾病是癌症。

[0406] 癌性疾病(Cancerous diseases)包括但不限于癌(carcinoma)、淋巴瘤(lymphoma)、胚细胞瘤(blastoma)、肉瘤(sarcoma)和白血病(leukemia)。癌性疾病的具体实例但不限于:髓性白血病(Myeloid leukemia)、例如慢性髓性白血病(Chronic myelogenous leukemia)、急性髓性白血病伴有成熟(acute myelogenous leukemia with maturation)、急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia)、急性非淋巴细胞白血病伴嗜碱性粒细胞增多(acute nonlymphocytic leukemia with increased basophils)、急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia)、急性髓细胞白血病伴嗜酸性粒细胞增多症(acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia);恶性淋巴瘤(malignant lymphoma),如Birkitt氏及Non-Hodgkin氏;淋巴细胞白血病(lymphocytic leukemia),如急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia),慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia);骨髓增生性疾病(myeloproliferative diseases),如实体瘤良性脑膜瘤(solid tumors benign meningioma)、唾液腺混合瘤(Mixed tumors of salivary gland)、结肠腺瘤(colonic adenomas);腺癌(adenocarcinomas),如小细胞肺癌(Small cell lung cancer)、肾、子宫、前列腺、膀胱、卵巢、结肠、肉瘤(sarcomas)、脂肪肉瘤(liposarcoma)、粘液样(myxoid)、滑膜肉瘤(synovial sarcoma)、横纹肌肉瘤(Rhabdomyosarcoma)、肺泡(alveolar)、骨外粘液样软骨肉瘤(extraskelatel myxoid chondrosarcoma)、尤文氏肿瘤(Ewing's tumor);其他包括睾丸和卵巢无性细胞瘤(Testicular and ovarian dysgerminoma)、视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma)、肾母细胞瘤(Retinoblastoma)、威尔姆斯氏肿瘤(Wilms'tumor)、神经母细胞瘤(neuroblastoma)、恶性黑色素瘤(malignant melanoma)、间皮瘤(mesothelioma)、乳腺癌、皮肤癌、胰腺癌、子宫颈癌、前列腺癌和卵巢癌。

[0407] 因此,本教导可用于疾病检测。以下是非限制性实施例,其涉及早期癌症检测。

[0408] 在根据本教导进行疾病诊断之后,使用金标准方法证实筛选结果。一旦根据本教导或使用金标准方法建立诊断,就告知所述对象诊断结果并根据需要进行治疗。

[0409] 因此根据本发明的一些实施例的一方面,提供一种在有此需要的对象中进行疾病治疗的方法,所述方法包括:

[0410] (a) 根据上述方法诊断所述对象中是否存在疾病;以及

[0411] (b) 根据诊断治疗所述对象。

[0412] 本发明的实施例具有多种应用,涉及个别地优化疾病治疗,监测一对象的疾病治疗,决定一对象的治疗,以及识别能够治疗与异常代谢活动相关的疾病的药剂。

[0413] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供一种个别地优化疾病治疗的方法,所述方法包括:

[0414] 使用本文所述的任何一种相关方法(包括其任何实施例),决定所述对象的生物样品中代谢物的存在和/或量,所述对象包含一细胞以及至少一药物,

[0415] 而代谢活动的变化(如本文所述,通过一或多种代谢物的水平进行测量,相对于在相同条件下,检查的正常健康细胞样品的一或多种代谢物的水平)指示所述疾病的有效药物。

[0416] 如本文所用,“个别地优化治疗(individually optimizing treatment)”是指一

种用于定制治疗方案的离体(ex-vivo)方法(例如,药物类型、剂量)。

[0417] 如本文所用,“药物(medicament)”描述了药剂(medicine, medicinal drug或medication)的制剂,如本文可互换使用的。药物的实例包括但不限于化学疗法、抗生素、抗寄生虫药、抗病毒药等。

[0418] 如本文所用,对于本文所述的任何相关实施例,“疗法(therapy)”描述一治疗剂,其在本文中也称为一药物(medicament),以及其他治疗,例如辐射、脱水、失活等。

[0419] 如本文所述,如本文所用,生物样品的细胞与传感系统的样品隔室内的药物或任何其他处理剂接触。在本文中,术语“接触”是指在使药物与细胞膜接触并且如果需要内化的条件下将药物带入细胞附近。因此,例如接触应在缓冲条件下,在足以使药物影响细胞表现型(phenotype,例如细胞毒性或细胞抑制作用)的温度和时间下进行。接触可以在体外(in vitro)、离体(ex vivo)或体内(in vivo)进行。

[0420] 根据一具体的实施例,“细胞的代谢活动的一转变,相对于在相同条件下,检查的正常健康细胞样品的代谢活动”指的是至少10%的局部或整体(整个概况)的转变,优选地朝向100%同一性,与对照正常健康细胞样品相比。

[0421] 如本领域技术人员决定超过一预定阈值的转变,表示具有有效治疗。

[0422] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供一种监测一对象的疾病治疗的方法,所述方法包括:

[0423] (a) 向所述对象施用至少一种对抗所述疾病的药物;

[0424] (b) 在施用后取回包含所述对象细胞的一生物样品;

[0425] (c) 将所述生物样品引入根据本文所述实施例中的任一者的传感系统;以及

[0426] 决定所述样品中一或多种代谢物的水平,

[0427] 其中至少一种代谢物,优选几种代谢物的水平指示细胞的代谢活性,而细胞的代谢活动的一转变,相对于在相同条件下,检查的正常健康细胞样品的代谢活动,表示有效治疗疾病。

[0428] 同样地,提供了一种识别能够改变细胞代谢活性的试剂的方法,所述方法包括:

[0429] (a) 使细胞经受一试剂;

[0430] (b) 在精受一试剂之前和之后,测量细胞的代谢活性,其中一或多种代谢物的水平变化指示能够改变细胞代谢活性的试剂。

[0431] 如本文所用,术语“试剂(agent)”是指包含一生物剂或一化学剂的测试组合物。

[0432] 可根据本发明的方法,测试作为代谢活动的潜在调节剂的生物剂的示例,包括但不限于核酸,例如多核苷酸(polynucleotides)、核酶(ribozymes)、siRNA和反义分子(包括但不限于RNA、DNA、RNA/DNA杂合体、肽核酸和多核苷酸类似物,其具有改变的骨架结构或其他化学修饰);蛋白质、多肽(例如肽)、碳水化合物、脂质和“小分子”候选药物。“小分子”例如可以是天然存在的化合物(例如衍生自植物萃取物,微生物培养液等的化合物)或合成有机或有机金属化合物,具有分子量小于约10,000道尔顿,优选地小于约5,000道尔顿,最优地选小于约1,500道尔顿。

[0433] 根据本发明所述方面的优选实施例,所述试剂是抗癌剂、抗病毒剂或抗生素剂。

[0434] 应当理解,如本文所使用的“转变”也可以是相同概况中的代谢活动的不同水平(例如更高水平);基础状态的变化以及/或者引起最大代谢活动效果的试剂浓度的转变。

[0435] 一旦根据上述教示识别能够改变细胞代谢活性的试剂,本发明还包括将试剂配制成药物组合物/药物。

[0436] 本方面描述的方法可用于筛选一疾病的治疗活性剂的主要候选者,用于筛选治疗特定对象疾病的治疗活性剂等等。

[0437] 根据一些实施例,一种监测受试者疾病治疗的方法,通过以下方式实现:

[0438] (a) 对所述对象施用至少一对抗所述疾病的药物;

[0439] (b) 在施用后取回包含所述对象细胞的一生物样品;

[0440] (c) 使用本文所述实施例中任一者所描述的任何传感方法和系统,监测在所述细胞的细胞外环境中产生一氧化剂或一还原剂的代谢物的存在和/或量,

[0441] 其中代谢物的存在和/或量的改变指示细胞的代谢活性,而细胞的代谢活动的一转变,相对于在相同条件下,检查的正常健康细胞样品的代谢活动,表示有效治疗疾病。

[0442] 在一些实施例中,如本文所述的任何系统和方法还包括用于从生物样品中分离靶细胞的装置,如本文所述。此方法包括,例如将样品引入样品隔室中的腔室并使样品与标记物、因子、活化剂、抑制剂或适于分离靶细胞的任何其他生物物质流体连通。然后靶细胞例如可以与培养基流体连通以及/或者在存在或不存在一条件下进行传感,如本文所述。示例性靶细胞是癌细胞。

[0443] 这种方法在本文中描述为芯片实验室(lab-on-chip)。

[0444] 在本文所述的任何应用中,通过决定生物样品中物质的存在和/或量,可以使用产生一可检测基团的非代谢物的物质,来诊断、治疗和/或监测如本文所述的治疗。

[0445] 在本文所述方法的一应用的本文所述的任何实施例中,使用如本文所述的用于检测氧化还原反应剂的传感系统,任选地与一或多个其他传感系统或传感器隔室结合,如本文所述。

[0446] 如本文所用的术语“约”是指10%,并且符号“ $\approx$ ”表示具有至多10%的公差的可相等性。

[0447] 术语“包括(comprises)”、“包括(comprising)”、“包括(includes)”、“包含(including)”、“具有(having)”及其词形变化是指“包括但不限于”。

[0448] 术语“由...组成(consisting of)”意指“包括并且限于”。

[0449] 术语“基本上由.....组成(essentially consisting of)”是指组合物、方法或结构可包括额外的成分、步骤及/或部件,但只有当额外的成分、步骤及/或部件实质上不改变所要求保护的组合物、方法或结构的基本特征及新特征。

[0450] 本文所使用的单数形式“一”、“一个”及“至少一”包括复数引用,除非上下文另有明确规定。例如,术语“一化合物”或“至少一种化合物”可以包括多个化合物,包括其混合物。

[0451] 在整个本申请中,本发明的各种实施例可以以一个范围的形式存在。应当理解,以一范围形式的描述仅仅是因为方便及简洁,不应理解为对本发明范围的硬性限制。因此,应当认为所述的范围描述已经具体公开所有可能的子范围以及所述范围内的单一数值。例如,应当认为从1到6的范围描述已经具体公开子范围,例如从1到3,从1到4,从1到5,从2到4,从2到6,从3到6等,以及所数范围内的单一数字,例如1、2、3、4、5及6,此不管范围为何皆适用。



[0452] 每当在本文中指出数值范围,是指包括所指范围内的任何引用的数字(分数或整数)。术语,第一指示数字及第二指示数字之间的范围”及第一指示数字”到”第二指示数字”的范围”在本文中可互换,并指包括第一及第二指示数字,及其间的所有分数及整数。

[0453] 如本文所用的术语“方法(method)”指的是用于完成一特定任务的方式(manner),手段(means),技术(technique)和程序(procedures),包括但不限于,那些方式,手段,技术和程序,其是已知的,或是从已知的方式,手段,技术或程序很容易地被化学,药理,生物,生化及医学领域从业者所开发。

[0454] 如本文所使用的,术语“治疗(treating)”包括消除(abrogate),本质上地抑制(substantially inhibiting),减慢或逆转(reversing)一状态的进展,本质上改善(ameliorating)一状态的临床或美学的症状,或本质上预防一状态的临床表现或美学症状。

[0455] 如本文所用,术语“胺(amine)”描述-NR'R”基团和-NR'-基团,其中R'和R”各自独立地为氢、烷基,环烷基,芳基,术语是如同在下文中定义。

[0456] 因此,胺基(amine group)可以是伯胺(primary amine),其中R'和R”都是氢,仲胺(secondary amine),其中R'是氢,R”是烷基、环烷基或芳基,叔胺(tertiary amine),其中每个R'和R”独立地为烷基、环烷基或芳基。

[0457] 或者R'和R”可以各自独立地为羟基烷基(hydroxyalkyl)、三卤代烷基(trihaloalkyl)、环烷基、烯基(alkynyl)、炔基(alkynyl)、芳基(aryl)、杂芳基(heteroaryl)、杂脂环(heteroalicyclic)、胺(amine)、卤化物(halide)、磺酸酯(sulfonate)、亚砷(sulfoxide)、膦酸酯(phosphonate)、羟基(hydroxy)、烷氧基(alkoxy)、芳氧基(aryloxy)、巯基(thiohydroxy)、硫代烷氧基(thioalkoxy)、硫代芳氧基(thioaryloxy)、氰基(cyano)、硝基(nitro)、偶氮(azo)、磺酰胺(sulfonamide)、羰基(carbonyl)、C-羧酸酯(C-carboxylate)、O-羧酸酯(O-carboxylate)、N-硫代氨基甲酸酯(N-thiocarbamate)、O-硫代氨基甲酸酯(O-thiocarbamate)、脲(urea)、硫脲(thiourea)、N-氨基甲酸酯(N-carbamate)、O-氨基甲酸酯(O-carbamate)、C-酰胺(C-amide)、N-酰胺(N-amide)、胍基(guanyl)、胍(guanidine)和胍(hydrazine)。

[0458] 术语“胺(amine)”,在胺是如下文所定义的末端基团(end group)的情况下,在本文中用于描述-NR'R”基团,并且在胺是连接基团(linking group)的情况下,在本文中用于描述-NR'-基团。

[0459] 在本文中,短语“末端基团(end group)”描述一基团(取代基),通过其一原子连接至化合物中的另一基团。

[0460] 短语“连接基团(linking group)”描述一基团(取代基),通过其两个或更多个原子连接至化合物中的两个和更多个基团。

[0461] 例如,当胺基团(amine group)在纳米结构的表面中产生时,其为末端基团,并且在与官能基团共价连接时,其为连接基团。

[0462] 术语“烷基、烷烃(alkyl)”描述了包括直链和支链基团的饱和脂族烃。优选地,烷基优选具有1至20个碳原子。每当一数值范围在本文中被描述;例如“1至20”,其暗示所述基团(在此情况下为烷基)可包含1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等,直至并包含20个碳原子。更优选地,所述烷基具有1至10个碳原子的中等大小的烷基。最优选地,除非另有说明,烷基

是具有1至4个碳原子的低级烷基(C1至C 4的烷基)。所述烷基可以是取代或未取代的,如本文所述。

[0463] 所述烷基(alkyl)可以是一末端基团(end group),如所述短语在上文中所定义,其中它连接于一单一相邻原子或一连接基团,如短语于上文所定义,其通过其链中的至少两个碳原子连接两个或多个基团。当烷基为一连接基团时,在本文中也称为“亚烷基(alkylene)”或“亚烷基链(alkylene chain)”。

[0464] 术语“氨基烷基(aminoalkyl)”在本文中用于描述被胺基取代的烷基,如本文所定义。在一些实施例中,胺基取代烷基中的一末端碳原子。

[0465] 术语“环烷基(cycloalkyl)”描述一全碳单环(all-carbon monocyclic ring)或多个融合中环(即共享相邻碳原子对的环)的基团,其中单环或多环不具有完全共轭 $\pi$ 电子系统。环烷基可以是取代或未取代的,如本文所述。所述环烷基可以是一末端基团(end group),如所述短语在上文中所定义,其中它连接于一单一相邻原子或一连接基团,如所述短语于上文所定义,所述连接基团于其两个和更多个位置连接两个或更多个基团。

[0466] 术语“芳基(aryl)”描述一全碳单环(all-carbon monocyclic ring)或多个融合中环(即共享相邻碳原子对的环)的基团,其中单环或多环具有完全共轭 $\pi$ 电子系统。所述芳基可以是取代或未取代的,如本文所述。所述芳基(aryl)可以是一末端基团(end group),如所述短语在上文中所定义,其中它连接于一单一相邻原子或一连接基团,如此短语于上文所定义,所述连接基团通于其两个和更多个位置连接两个或更多个基团。实例包括苯基(phenyl)、萘(naphthalene)、蒽(anthracene)等。

[0467] 术语“杂芳基(heteroaryl)”描述一全碳单环(all-carbon monocyclic ring)或多个融合中环(即共享相邻碳原子对的环)的基团,在所述环中具有一或多个原子,例如氮、氧和硫,并具有完全共轭的 $\pi$ 电子系统。杂芳基(heteroaryl)的非限制实例包括吡咯(pyrrole)、呋喃(furan)、噻吩(thiophene)、咪唑(imidazole)、恶唑(oxazole)、噻唑(thiazole)、吡唑(pyrazole)、吡啶(pyridine)、嘧啶(pyrimidine)、喹啉(quinoline)、异喹啉(isoquinoline)和嘌呤(purine)。杂芳基可以是取代或未取代的。取代的杂芳基可以具有一或多个取代基,如本文所述。所述杂芳基(heteroaryl)可以是一末端基团(end group),如所述短语在上文中所定义,其中它连接于一单一相邻原子或一连接基团,如此短语于上文所定义,所述连接基团通于其两个和更多个位置连接两个或更多个基团。代表性实例是吡啶(pyridine)、吡咯(pyrrole)、恶唑(oxazole)、吲哚(indole)、嘌呤(purine)等。

[0468] 术语“杂脂族(heteroalicyclic)”描述一全碳单环(all-carbon monocyclic ring)或融合中环的基团,在所述环中具有一或多个原子,例如氮、氧和硫。环也可以具有一或多个双键。然而,环不具有完全共轭 $\pi$ 电子系统。杂脂族(heteroalicyclic)可以是取代或未取代的。取代的杂芳基可以具有一或多个取代基,如本文所述。所述杂脂族(heteroalicyclic)可以是一末端基团(end group),如所述短语在上文中所定义,其中它连接于一单一相邻原子或一连接基团,如此短语于上文所定义,所述连接基团通于其两个和更多个位置连接两个或更多个基团。代表性实例是哌啶(piperidine)、哌嗪(piperazine)、四氢呋喃(tetrahydrofuran)、四氢吡喃(tetrahydropyran)、吗啉代(morpholino)等。

[0469] 术语“氧化胺(amino oxide)”描述-N(OR')(R'')或-N(OR')-基团,其中R'和R''如本

文所定义。所述术语是指-N(OR') (R")在胺氧化物(amine-oxide)为一末端基团的情况下,如所述短语在上文中定义,并且所述术语是指-N(OR')-基团在胺氧化物(amine-oxide)为一末端基团的情况下,如所述短语在上文中定义。

[0470] 无论何时取代本文所述的基团(group, moiety)或化合物,取代基例如可以是羟烷基(hydroxyalkyl)、三卤代烷基(trihaloalkyl)、环烷基(cycloalkyl)、烯基(alkenyl)、炔基(alkynyl)、芳基(aryl)、杂芳基(heteroaryl)、杂脂环(heteroalicyclic)、胺(amine)、卤化物(halide)、磺酸盐(sulfonate)、亚砷(sulfoxide)、膦酸盐(phosphonate)、羟基(hydroxy)、烷氧基(alkoxy)、芳氧基(aryloxy)、硫代羟基(thiohydroxy)、硫代烷氧基(thioalkoxy)、硫代芳氧基(thioaryloxy)、氰基(cyano)、硝基(nitro)、偶氮(azo)、磺酰胺(sulfonamide)、C-羧酸盐(C-carboxylate)、O-羧酸盐(O-carboxylate)、N硫代氨基甲酸盐(N thiocarbamate)、硫代氨基甲酸盐(O thiocarbamate)、尿素(urea)、硫脲(thiourea)、N氨基甲酸盐(N carbamate)、O氨基甲酸盐(O carbamate)、C酰胺(C amide)、N酰胺(N amide)、脒基(guanyl)、胍(guanidine)和胼(hydrazine)中的一种或多种,如本文所定义。

[0471] 术语“卤化物(halide)”和“卤素(halo)”表示氟、氯、溴或碘。

[0472] 术语“卤烷基(halo alkyl)”描述瞭如上定义的烷基,进一步被一或多种卤化物取代。

[0473] 术语“硫酸基(sulfate)”表示-O-S(=O)<sub>2</sub>-OR'基团或-O-S(=O)<sub>2</sub>-O-基团,其中R'如上所定义。

[0474] 术语“硫代硫酸基(thiosulfate)”表示-O-S(=S)(=O)-OR'基团或-O-S(=S)(=O)-O-基团,其中R'如上所定义。

[0475] 术语“亚硫酸基(sulfite)”表示-O-S(=O)-O-R'基团或-O-S(=O)-O-基团,其中R'如上所定义。

[0476] 术语“硫代亚硫酸基(thiosulfite)”表示-O-S(=S)-O-R'基团或-O-S(=S)-O-基团,其中R'如上所定义。

[0477] 术语“亚磺酸盐(sulfinate)”表示-S(=O)-OR'基团或-S(=O)-O-基团,其中R'如上所定义。

[0478] 术语“亚砷基(sulfoxide)”或“亚磺酰基(sulfinyl)”表示-S(=O)R'基团或-S(=O)-基团,其中R'如上所定义。

[0479] 术语“磺酸酯(sulfonate)”表示-S(=O)<sub>2</sub>-R'基团或-S(=O)<sub>2</sub>-基团,其中R'如本文所定义。

[0480] 术语“S-磺酰胺(S-sulfonamide)”表示-S(=O)<sub>2</sub>-NR'R"基团或-S(=O)<sub>2</sub>-NR'-基团,其中R'和R"如本文所定义。

[0481] 术语“N-磺酰胺(N-sulfonamide)”表示R'S(=O)<sub>2</sub>-NR"-或S(=O)<sub>2</sub>NR'-基团,其中R'和R"如本文所定义。

[0482] 术语“二硫化物(disulfide)”是指-S-SR'末端基团或-S-S-连接基团,这些短语如上文所定义,其中R'如本文所定义。

[0483] 本文所用的术语“羰基(carbonyl)”或“碳酸酯(carbonate)”表示-C(=O)-R'基团或-C(=O)-基团,其中R'如本文所定义。

[0484] 本文所用的术语“硫代羰基(thiocarbonyl)”表示-C(=S)-R'基团或-C(=S)-基

團,其中R' 本文所定义。'

[0485] 術語“肱基(oxime)”表示=N-OH基團或=N-O-基團,这些短语如上文所定义。

[0486] 術語“羥基(hydroxyl)”表示-OH基團。

[0487] 術語“烷氧基(alkoxy)”表示如本文所定義的-O-烷基和-O-環烷基,如本文所定义。

[0488] 術語“芳氧基(aryloxy)”表示如本文所定義的-O-芳基和-O-雜芳基,如本文所定义。

[0489] 術語“硫代羥基(thiohydroxy)”表示-SH基團。

[0490] 術語“硫代烷氧基(thioalkoxy)”表示如本文所定義的-S-烷基和-S-環烷基。

[0491] 術語“硫代芳氧基(thioaryloxy)”表示如本文所定義的-S-芳基和-S-雜芳基。

[0492] 術語“氰基(cyano)”表示-C≡N基團。

[0493] 術語“异氰酸基(isocyanate)”表示-N=C=O基团。

[0494] 術語“硝基(nitro)”表示-NO<sub>2</sub>基团。

[0495] 術語“酰卤(acyl halide)”描述瞭如上所定义的-(C=O)R'”基团,其中R'”是卤素。

[0496] 術語“偶氮(azo)”或“重氮(diazo)”描述-N=NR' 末端基团或-N=N连接基团,这些短语如上文所定义,其中R' 如上文所定义。

[0497] 術語“C羧酸基(C carboxylate)”描述-C(=O)-OR' 末端基团或-C(=O)-O-连接基团,其中R' 如本文所定义。

[0498] 術語“O羧酸基(O carboxylate)”描述-OC(=O)R' 末端基团或-OC(=O)-连接基团,其中R' 如本文所定义。

[0499] 術語“C硫代羧酸基(C thiocarboxylate)”表示-C(=S)-OR' 末端基团或-C(=S)-O-连接基团,其中R' 如本文所定义。

[0500] 術語“O硫代羧酸基(O thiocarboxylate)”表示-OC(=S)R' 末端基团或-OC(=S)-连接基团,其中R' 如本文所定义

[0501] 術語“N-氨基甲酸基(N-carbamate)”表示R'OC(=O)-NR' -末端基团或OC(=O)-NR' -连接基团,其中R' 和R”如本文所定义。

[0502] 術語“O-氨基甲酸基(O-carbamate)”表示-OC(=O)-NR' R”末端基团或-OC(=O)-NR' -连接基团,其中R' 和R”如本文所定义。

[0503] 術語“O-硫代氨基甲酸基(O-thiocarbamate)”表示-OC(=S)NR' R”末端基团或-OC(=S)NR' -连接基团,其中R' 和R”如本文所定义。

[0504] 術語“N-硫代氨基甲酸基(N-thiocarbamate)”表示R'OC(=S)NR' -末端基团或-OC(=S)NR' -连接基团,其中R' 和R”如本文所定义。

[0505] 術語“S-二硫代氨基甲酸基(S-dithiocarbamate)”描述了-SC(=S)NR' R”末端基团或-SC(=S)NR' -连接基团,其中R' 和R”如本文所定义。

[0506] 術語“N-二硫代氨基甲酸基(N-dithiocarbamate)”表示R'”SC(=S)NR' -末端基团或-SC(=S)NR' -连接基团,其中R' 和R”如本文所定义。

[0507] 術語“脲(urea)”,在本文中也称为“脲基(ureido)”,描述了-NR' C(=O)-NR' R””末端基团或-NR' C(=O)-NR' -连接基团,其中R' 和R”如本文所定义,R'”如本文中R' 和R”所定

义。

[0508] 术语“硫脲(thiourea)”在本文中也称为“硫脲基(thioureido)”,表示 $-NR' -C(=S) -NR''R'''$ 末端基团或 $-NR' -C(=S) -NR''$ -连接基团, $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 如本文所定义。

[0509] 术语“C-酰胺”表示 $-C(=O) -NR' R''$ 末端基团或 $-C(=O) -NR'$ -连接基团,其中 $R'$ 和 $R''$ 如本文所定义。

[0510] 术语“N-酰胺”表示 $R' C(=O) -NR''$ -末端基团或 $R' C(=O) -N$ -连接基团,其中 $R'$ 和 $R''$ 如本文所定义。

[0511] 术语“鸟嘌呤(guanyl)”表示 $R' R'' NC(=N) -$ 末端基团或 $-R' NC(=N) -$ 基团,其中 $R'$ 和 $R''$ 如本文所定义。

[0512] 术语“胍(guanidine)”表示 $-R' NC(=N) -NR''R'''$ 末端基团或 $-R' NC(=N) -NR''$ -连接基团,其中 $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 为如本文所定义。

[0513] 术语“肼(hydrazine)”描述 $-NR' -NR''R'''$ 末端基团或 $-NR' -NR''$ -连接基团,其中 $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 为如本文所定义。

[0514] 术语“甲硅烷基(silyl)”描述 $-SiR' R''R'''$ 末端基团或 $-SiR' R''$ -连接基团,这些短语如上文所定义,其中 $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 中的各者如本文所定义。

[0515] 术语“甲硅烷氧基(siloxy)”描述 $-Si(OR') R''R'''$ 末端基团或 $-Si(OR') R''$ -连接基团,这些短语如上文所定义,其中 $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 中的各者如本文所定义。

[0516] 术语“硅氮烷(silaza)”描述 $-Si(NR' R'') R'''$ 末端基团或 $-Si(NR' R'')$ -连接基团,这些短语如上文所定义,其中 $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 中的各者如本文所定义。

[0517] 术语“四原硅酸盐(tetraorthosilicate)”描述 $-O-Si(OR')(OR'')(OR''')$ 末端基团或 $-O-Si(OR')(OR'')$ -连接基团,这些短语如上文所定义,其中 $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 中的各者如本文所定义。

[0518] 本文所用的术语“酰肼(hydrazide)”表示 $-C(=O) -NR' -NR''R'''$ 末端基团或 $C(=O) -NR' -NR''$ -连接基团,这些短语如上文所定义,其中 $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 如本文所定义。

[0519] 如本文所用,术语“硫代酰肼(thiohydrazide)”表示 $-C(=S) -NR' -NR''R'''$ 末端基团或 $-C(=S) -NR' -NR''$ -连接基团,这些短语如上文所定义,其中 $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 如本文所定义。

[0520] 如本文所用,术语“亚甲基胺(methyleneamine)”描述 $-NR' -CH_2 -CH=CR'' R'''$ 末端基团或 $-NR' -CH_2 -CH=CR''$ -连接基团,这些短语如上文所定义,其中 $R'$ 、 $R''$ 和 $R'''$ 如本文所定义。

[0521] 可以理解,本发明中的特定特征,为清楚起见,在分开的实施例的内文中描述,也可以在单一实施例的组合中提供。相反地,本发明中,为简洁起见,在单一实施例的内文中所描述的各种特征,也可以分开地、或者以任何合适的子组合、或者在适用于本发明的任何其他描述的实施例中提供。在各种实施例的内文中所描述的特定特征,并不被认为是那些实施方案的必要特征,除非所述实施例没有那些元素就不起作用。

[0522] 上文所述的及以权利要求项部分所请求的本发明各种实施例和方面,可在以下的实施例中找到实验支持。

[0523] 示例:

[0524] 现在参考以下示例,其与以上描述一起以非限制性方式说明本发明的一些实施例。

[0525] 示例1

[0526] 系统制造:

[0527] 根据本发明的一些实施例,一示例性微流体生物传感系统(在本文中也称为微流体阵列或芯片)可用作一纳米线材生物传感器,用于代谢物的多重实时监测,如图1A和图1B所示。

[0528] 所述示例性系统包括具有若干孔洞的培养隔室,所述孔洞含有一或多种溶液(例如含有细胞、还原剂和/或氧化酶的溶液),在孔洞中单独排列或组合排列。这些孔通过微通道与传感隔室而流体连通。传感隔室包括多个功能化的纳米结构。通过操电磁阀关闭或打开流体连通通道,可将溶液从孔洞引入传感隔室。

[0529] 阀门允许切换多个不同的样品以用于多重传感。

[0530] 在传感隔室中,硅纳米线材场效应晶体管(SiNW FET)阵列用氧化还原反应性官能基团修饰,例如9,10-蒽醌-2-磺酰氯(9,10-anthraquinone-2-sulfochloride)用于传感活性氧物质(reactive oxygen species,ROS),以及其他产生ROS的小分子代谢物。产生ROS的代谢物在接触FET阵列之前反应以产生 $H_2O_2$ (例如过氧化物, $H_2O_2$ ),例如,在氧化酶存在下,如图1C和图1D所示。

[0531] 然后,ROS或随后的 $H_2O_2$ 在FET表面上将9,10-二羟基蒽(9,10-dihydroxyanthracene)氧化,以形成9,10-蒽醌(9,10-anthraquinone)(图1D)。所述氧化反应降低了表面电子密度,而还原剂如DEHA将9,10-蒽醌还原为9,10-二羟基蒽以增加表面电子密度。

[0532] 通过氧化或还原而改变的表面电子密度改变了测量的电流。

[0533] 上述微流体芯片如下制造。

[0534] 场效应晶体管(FET)制造:

[0535] 通过光刻法制造传感隔室的核心,即SiNW-FET阵列。FET的源极和漏极由一多层光阻结构所限定,所述结构由LOR5A(Microchem)和S1805(Shipley)组成。FET的源极和漏极之间的间隙为 $2\mu m$ 。在曝光和显影光阻之后,通过电子束蒸发Ti/Pd/Ti(分别为5/60/10纳米)使图案金属化。然后使用通过在 $80^\circ C$ 下以等离子体增强化学气相沉积法(plasma-enhanced chemical vapor deposition)(ICP-PECVD,Axic Inc.)所层积的一层60纳米的 $Si_3N_4$ ,以及通过原子层沉积(ALD)所制备的一层20纳米的氧化铝层(Savannah200系统,Cambridge Nanotech),-将电极进行绝缘。

[0536] 表面修饰:

[0537] 在制造SiNW FET阵列之后,对芯片进行化学修饰以执行细胞代谢物的传感(例如图2中所示)。

[0538] 9,10-蒽醌-2-磺酰氯(9,10-anthraquinone-2-sulfochloride)的制备:

[0539] 如图2的插图所示,使用草酰氯(oxalyl chloride)和DMF在甲苯(toluene)中将9,10-蒽醌-2-磺酸钠(sodium 9,10-anthraquinone-2-sulfonate)的磺酸盐基团转化为磺酰氯(sulfochloride)。

[0540] 将蒽醌-2-磺酸钠(sodium anthraquinone-2-sulfonate,5克,0.0158摩尔)和甲苯(150毫升)的混合物置于0.25升圆底烧瓶中,所述烧瓶装自动水分离器(Dean-Stark分水器)和冷凝器,混合物在回流下加热2小时以干燥反应混合物。然后将混合物冷却至 $60^\circ C$ ,加

入草酰氯 (6毫升) 和DMF (2滴)。将所得混合物在回流下加热8小时,然后蒸馏过量 (30毫升) 的甲苯和草酰氯的混合物。过滤收集氯化钠沉淀,减压下从滤液中除去溶剂。将固体残余物真空干燥过夜,得到蒽醌-2-磺酰氯 (anthraquinone-2-sulfochloride, 4.36克, 90%产率)。

[0541] 9,10-蒽醌功能化的SiNW FET的制备:

[0542] 在制造之后,依次用丙酮 (acetone)、异丙醇 (isopropyl alcohol, IPA) 和去离子水 (DIW) 洗涤SiNW FET阵列芯片,然后进行氮气干燥。施加氧等离子体 (Oxygen plasma, 100W, 0.2Torr) 15分钟。紧接着,芯片被100微升的 (3-氨基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷 ((3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane, APDMES; SIA0603.0, Gelest Inc.) 大约覆盖10分钟。然后,将芯片置于65°C的热板上2小时。然后用IPA再次洗涤芯片表面,然后进行氮气干燥。

[0543] 然后将经APDMES处理过的芯片置于115°C的热板上25分钟,然后浸入含有50毫克的9,10-蒽醌-2-磺酰氯 (9,10-anthraquinone-2-sulfochloride)、20毫克的超干燥甲苯 (extra-dry toluene, 201547, Bio-lab Ltd.) 和1毫升的超干燥吡啶 (extra-dry pyridine, 270970, SIGMA) 的混合物中,在室温下24小时,形成磺酰胺,其将9,10-蒽醌基团和Si NW修饰表面相连接。

[0544] 表面表征:

[0545] 使用质谱法 (Autospec M250Q, Waters) 通过应用以下参数验证用于表面修饰的9,10-蒽醌-2-磺酰氯的元素组成:电子轰击的测量模式,在70eV的正电离下,CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>作为溶剂。

[0546] 使用X射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 来表征9,10-蒽醌-2-磺酰氯处理过的修饰的FET上的单一层。

[0547] 在超高真空 ( $2.5 \times 10^{-10}$  托 (Torr) 的基础压力) 下进行XPS测量 (Multi-Technique System 5600, PHI)。用AlK $\alpha$ 单色光源 (1486.6eV) 照射样品,并通过球形电容分析仪以0.8毫米的狭缝孔径来分析结果电子。

[0548] 图2A至图2C显示在氧化还原反应性SiNW FET的表面修饰和表征期间,在XPS测量中所获得的数据。图2A显示修饰前SiNW表面的XPS测量结果。图2B表示使用APDMES使SiNW表面硅烷化,以产生氨基,之后进行XPS测量。图2C显示磺酰胺键的形成,其将9,10-蒽醌基团连接至氨基修饰过的表面。在图2A至图2C的各者中,给出了每个修饰步骤中碳 (C)、氮 (N) 和硫 (S) 的修饰表面的XPS光谱和原子组成。

[0549] 图2A至图2C中,显示在各修饰步骤中,所获得的XPS光谱和修饰表面的碳 (C)、氮 (N) 和硫 (S) 原子组成。

[0550] 图2D显示氧化的9,10-蒽醌修饰的硅纳米线材表面 (蓝色曲线) 和还原的9,10-二羟基蒽修饰的硅纳米线材表面 (红色曲线) 的XPS代表性测量光谱。根据C1s曲线拟合来计算C=O键的百分比。在表面还原后,观察到C=O键的群体 (population) 减少。

[0551] 用于估计氧化还原过程中表面化学的样品通过使用1毫摩尔浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>而被氧化,或通过1%v/v的DEHA (N,N-二乙基羟胺, N,N-diethylhydroxylamine) 而被还原。由于在测量期间样品略微带电荷,因此输入被数学校正,其中C1s在285eV处被用作为能量参考。所有测量均在25°的浅出射角 (shallow take-off angle) 下进行。

[0552] PDMS细胞培养隔室采用螺线管驱动的PDMS阀门:

[0553] 使用软光刻制造具有电磁(solenoid)致动阀的PDMS(聚二甲基硅氧烷, polydimethylsiloxane)培养隔室,例如图1A和图1B所示,用于细胞培养和多种溶液的控制。根据Hulme等人所述(Lab Chip 2009,9(1):79-86),制造电磁致动阀。然后将阀门加入PDMS培养隔室中。

[0554] 示例2

[0555] 传感:

[0556] 实验方法:

[0557] 一般传感设置:

[0558] 一数据采集系统用于测量在分析物溶液中分析物的氧化过程中由ROS或H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,或是在分析物溶液中分析物的还原过程中由还原剂通过表面电荷所诱导的SiNW FET (I<sub>ds</sub>) 电流。

[0559] 为了测量细胞代谢物/活动,将细胞在芯片中培养,即在其培养隔室中培养(例如参见图1A),同时在测量期间将芯片置于培养器中。通过使用注射泵将样品以20微升每分钟引入传感隔室。

[0560] 施加到漏极和源极(V<sub>ds</sub>)的电压为0.2V,而栅极电压(V<sub>g</sub>)由传感之前的I<sub>ds</sub>-V<sub>g</sub>特性确定。

[0561] 以1秒的间隔记录电流-时间信号。

[0562] 由于数据采集系统的预置,所有采集的信号都被反转。在测量期间,样品的切换可能已经在电性读数中引入一些杂讯。在每次测量之后,用1%v/v的DEHA的还原剂取代分析物溶液,以还原FET表面(参见图1D)以达到用于后续测量的电性基准水平。

[0563] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>传感:

[0564] 对于含有各种浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的溶液,使用数据采集系统测量由H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>通过表面电荷所诱导的SiNW FET (I<sub>ds</sub>)的电流。

[0565] 乳酸、葡萄糖和丙酮酸传感:

[0566] 对于乳酸盐传感,在乳酸盐到达FET阵列之前,将0.1单位/毫升乳酸氧化酶(LOX; L0638, SIGMA)加入无酚红基质(phenol red-free medium)中将以乳酸盐转化为丙酮酸盐和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(如图1D所示)。

[0567] 用40单位/毫升的葡萄糖氧化酶(GOX;G2133, SIGMA)于PBS中类似地进行的葡萄糖传感。

[0568] 对于丙酮酸传感,在含有0.625单位/毫升丙酮酸氧化酶(POX;P4105, SIGMA)、21.90毫摩尔浓度的氯化镁、1.06毫摩尔浓度的硫胺素焦磷酸盐(thiamine pyrophosphate, TPP)以及0.27毫摩尔浓度的黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)进行测量。

[0569] 可以在添加血清的培养基中在pH7.0下进行传感。

[0570] pH传感:

[0571] 通过使用添加有还原剂的溶液,实现将修饰的FET转化为一pH传感器。在补充具有0.1%v/v的DEHA的培养基还原修饰的FET表面之后,通过质子化或通过去质子化,修饰的表面的质子密度的变化,主要改变了被测量的电流。根据观察结果,在培养基中添加0.1%v/v的DEHA不会引起pH值的显著变化。



[0572] 统计分析:

[0573] 传感特性的数据在平均值±标准偏差(SD)中,因为标准偏差(SD)被认为是所研究的纳米线材器件的平均值的可变性指标。

[0574] 结果:

[0575] 在图3A至图3B中,显示了因应于添加血清的培养基中的 $H_2O_2$ ,9,10-二羟基萘修饰的SiNW FET的传感。

[0576] 图3A描绘修饰的FET在不同浓度的 $H_2O_2$ 中的氧化动力学,以及在还原剂流动时相应的还原动力学。

[0577] 获得的数据显示,不含 $H_2O_2$ 添加剂的添加血清的培养基,也引起一可检测的信号。建议性地,来自不含 $H_2O_2$ 添加剂的添加血清的培养基的信号,可能是由于其内容物的复杂性。因此所述信号被视为背景信号。因此通过背景信号减去来自样品的采集信号,以从 $H_2O_2$ 获得真实信号。

[0578] 如图3A所示,从9,10-二羟基萘修饰的FET所获得的信号是浓度依赖性的,而使用APDMES修饰的FET发现不显著的传感反应。

[0579] 获得的数据进一步显示在将 $H_2O_2$ 样品引入FET约600秒后,获得的信号的浓度依赖性显著的,而使用APDMES修饰的FET发现不显著的传感反应。这些发现首先肯定了9,10-二羟基萘修饰的SiNW FET的 $H_2O_2$ 特异性传感能力,并进一步表明可在10分钟内分辨 $H_2O_2$ 浓度。这些发现证明了所述系统适用于监测代谢变化,持续数小时长时间跨度。

[0580] 所获得的数据进一步表明,通过流过诸如1%v/v DEHA的还原剂,还原的FET表面的信号,在约300秒内达到基准水平,因此证明在所述短时间内,系统已准备好用于随后的传感,并且氧化还原反应性FET的生物传感器具有一良好的传感可逆性。应注意,在还原剂到达FET阵列之前,溶液切换到还原剂而导致电读数跳跃。

[0581] 图3A(插图)进一步表示相关官能基团的表面化学键群的比较,以区分被修饰的单层在氧化和还原时的分子差异。如其中所示,表面的还原减少了C=O键群。另见图2。

[0582] 另外,测量 $H_2O_2$ 的传感回应,其作为浓度和pH值的函数,并且获得的数据显示在图3B中。结果表明, $H_2O_2$ 的传感极限为100纳摩尔浓度,传感回应覆盖 $H_2O_2$ 的生理浓度范围。例如参见,Lacy等人所著,高血压杂志Journal of Hypertension 1998,16(3):291-303。

[0583] 传感小分子代谢物:

[0584] 氧化酶(oxidase enzymes)将代谢物转化为 $H_2O_2$ ,有助于传感小分子代谢物。

[0585] 图4A显示在含有血清培养基中,乳酸浓度依赖性的传感特征。如其中所示,对于不含乳酸盐的溶液,添加LOX的样品(左起第一条红色曲线)的信号高于其无LOX的对应物(黑色曲线)。同样,两种信号之间的差异可能是由于添加血清的培养基的高复杂性。因此,两个信号之间的差异被定义为背景信号。

[0586] 为了从乳酸盐中获得真实信号,添加LOX的样品的读数减去无LOX相应的样品的读数,即减去无LOX空白培养基的信号,因为无LOX的乳酸盐样品不会导致任何氧化还原而改变所测量的电流。从获得的乳酸信号中进一步减去背景信号。在图4A的插图中给出了相应的标准曲线。

[0587] 所获得到的数据表明,添加血清的培养基中乳酸的传感极限为 $1\mu M$ ,检测范围覆盖了乳酸的生理范围。例如参见,Wacharasint等人所著Shock2012,38(1):4-10。

[0588] 图4B显示了在PBS中获得的葡萄糖感应反应的数据。与乳酸传感相似,为了从葡萄糖获取信号,添加GOX的样品的读数减去无GOX添加的样品的读数,因为无GOX存在的葡萄糖添加剂不会产生 $H_2O_2$ 而与氧化还原反应性FET传感器反应。相应的标准曲线显示在插图中。

[0589] 获得的数据显示PBS中葡萄糖的传感极限为 $10\mu M$ ,检测范围覆盖葡萄糖的生理范围。例如参见,Lu等人所著(2009)同上。

[0590] 图4C显示在PBS中丙酮酸传感反应。添加POX的样品的读数为红色,而无POX样品的读数为黑色。为了从丙酮酸获得真实信号,首先添加POX的样品的读数减去无POX相应的样品的读数,即减去无POX空白培养基的信号,因为无POX的丙酮酸样品不会导致任何氧化还原而改变所测量的电流。

[0591] 应注意,在PBS中丙酮酸传感中未发现显著的背景信号,表明背景传感信号取决于传感基质的复杂性。

[0592] pH传感:

[0593] 通过简单地添加还原剂,将如上所述修饰的FET转换成pH传感器,如图5A中示意性所示。在以DEHA补充培养基,以将被修饰的单层还原成9,10-二羟基蒽以及减少 $H_2O_2$ 含量后,通过质子化或通过去质子化,表面的质子密度的变化,主要改变了被测量的电流。

[0594] 对于pH传感,在传感基质中补充0.1%v/v DEHA,以还原FET表面上的9,10-蒽醌单层,以获得9,10-二羟基蒽(也参见图1D)以及同时减少 $H_2O_2$ 。因此,补充DEHA的基质中没有显著量的 $H_2O_2$ 来改变一被测量的信号。结果通过质子化或通过去质子化,表面的质子密度的变化,主要改变了被测量的电流。

[0595] 根据我们的观察结果,在培养基中添加0.1%v/v DEHA不会引起pH值的显著变化。

[0596] 图5B显示添加还原剂的培养基中pH依赖性的传感反应。如其中所示,pH传感灵敏度为0.2pH单位,并且所述检测能力覆盖了生理pH范围。

[0597] 图5C显示在不含还原剂的培养基和添加还原剂的培养基中对 $H_2O_2$ 的比较传感。如其中所示,在添加还原剂的培养基中, $H_2O_2$ 浓度低于1微摩尔浓度,其完全覆盖血液中过氧化氢的正常生理水平[Lacy等人所著,高血压杂志Journal of hypertension 1998,16(3):291-303;Valko等人所著Int J Biochem Cell B 2007,39(1):44-84]与来自无还原剂的培养基的信号相比,没有引起显著的信号。换句话说,在添加还原剂的培养基中,传感器在正常生理浓度下,对 $H_2O_2$ 不敏感。因此,通过使用补充有还原剂的溶液,能够实现9,10-二羟基蒽修饰的NW FET的pH传感特异性。

[0598] 示例3:

[0599] 监测细胞的代谢活动:

[0600] 实验方法:

[0601] 细胞培养、药物治疗和活力评估:

[0602] 培养人T淋巴细胞Jurkat (TIB-152,ATCC)并在 $37^\circ C$ 下,潮湿的5% $CO_2$ 大气下培养。使用的培养基是具有10%胎牛血清(FBS;04-001-1A,Biological Industry)和1%青霉素/链霉素(penicillin/streptomycin,15140,GIBCO)的RPMI1640培养基(52400,GIBCO)。

[0603] 在实验期间,在存在或不存在药物的情况下将细胞重悬浮于无酚红培养基(phenol red-free medium,11835-063,GIBCO)中,甲氨蝶呤水合物(methotrexate hydrate,MTX;M8407,SIGMA)或2-脱氧-D-葡萄糖(2-deoxy-D-glucose,2DG;D6134,SIGMA),

密度为 $1 \times 10^6$ 个细胞/毫升。

[0604] 将细胞样品分配到一培养器中传感芯片的孔洞中(参见图1A和图1B)。

[0605] 通过使用血细胞计数器计数台盼蓝(trypan)染色的细胞来估计细胞活力。

[0606] 原代人类B细胞的分离:

[0607] 从健康提供者和慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者所获得外周血(peripheral blood, PB)细胞。

[0608] 为了分离低密度细胞,使用Ficoll-Paque(GE Healthcare)分级分离PB细胞。将分离的细胞重悬于无酚红血清的基质(phenol red-free serum medium)中以用于传感。

[0609] 为了分离B淋巴细胞(CD19+),按照制造商的说明,使用B细胞纯化试剂盒微免疫磁珠(B-cells purification kit micro-immunomagnetic beads, Miltenyi Biotec)对来自患者样品的PB低密度细胞或来自健康样品的PB进行分级,并且分级的B细胞立即用于感应。

[0610] 如上所述进行传感。

[0611] 分析上,流式细胞术分析证实了超过93%的正常或CLL分级细胞是CD19+。

[0612] 使用二氯二氢荧光素(dichlorodihydrofluorescein, DCFH)进行细胞外ROS/乳酸测定:

[0613] 通过使用二氯二氢荧光素进行对照实验,用于与细胞的纳米线材传感进行比较。原则上,DCFH通过ROS被氧化成荧光二氯荧光素(dichlorofluorescein, DCF)。

[0614] 如Cathcart等人所述制备DCFH。[Analytical biochemistry 1983, 134(1):111-116]。

[0615] 将Jurkat细胞在含有10%FBS和1%青霉素/链霉素的无酚红(phenol red-free) RPMI 1640基质中培养,密度为 $1 \times 10^6$ 活细胞/毫升。

[0616] 在测量之前,移除细胞以获得无细胞的基质。然后,向无细胞基质样品中加入DCFH,并以每孔洞100微升装入96孔黑色板的孔洞中。将板置于光照下并在室温下温育10分钟,然后使用读板仪(i-200, Tecan)分析以确定随后在波长525nm处荧光DCF的发射强度。

[0617] 使用DCFH,类似地估计乳酸代谢物的浓度。主要额外的步骤是将细胞样品与0.004单位/毫升的LOX在37°C下孵育5分钟,然后向样品中加入DCFH进行测量。为了从乳酸获得信号,额外的添加LOX的样品的读数减去无LOX的对应物的读数。

[0618] 统计分析:

[0619] 关于细胞代谢物的数据以平均值±标准误差(SEM)或标准偏差(SD)表示。此外,进行双尾双样品t检验以统计分析关于细胞代谢物的数据的意义。

[0620] 结果:

[0621] 使用T细胞系进行传感:

[0622] 活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)作为氧的正常代谢的天然副产物形成,并且在调节各种生物过程中作为信号分子具有重要作用。作为信号分子,ROS的一重要特征是其在不同隔室之间移动的能力,例如穿过细胞膜。因此,升高的细胞内ROS将通过细胞膜扩散到细胞外空间,作为显示代谢活动的指示剂。

[0623] 通过使用纳米线材生物传感器测量细胞外ROS水平,进行24小时监测药物处理的Jurkat细胞的代谢活性,并且获得的数据显示在图6A至图6G中。

[0624] 通过MTX处理的Jurkat细胞的数据显示在图6A至图6C中,而通过2DG处理的细胞显

示在图6D至图6F中。

[0625] 测量的ROS水平通过活细胞的数量标准化。

[0626] 图6B和图6E至图6F中呈现的相对细胞计数是 $t=24$ 小时时的细胞计数与原代细胞计数的比率。

[0627] 结果显示,在 $t=6$ 小时时发现MTX处理的和2DG处理的Jurkat细胞的ROS水平显著降低(参见图6A和图6D)。这可以通过抗氧化剂与低水平过氧化氢反应来解释[Valko等人(2007) and Wacharasint等人(2012) supra]。

[0628] 结果进一步表明,在24小时处理后,药物处理的Jurkat细胞的ROS水平显著积累(参见图6A和图6D),并且细胞增殖率已降低(参见图6B和6E)。

[0629] 获得的数据可用于分析作用机制。可能表明在尝试降低ROS水平后可以刺激促氧化剂(pro-oxidant)的表达。因此,促氧化剂可以通过产生活性氧物质(ROS)或通过抑制抗氧化剂来诱导氧化应激(oxidative stress)[Sablina等人所著Nat Med 2005,11(12):1306-1313],从而抑制细胞增殖[López-Lázaro M.Cancer letters 2007,252(1):1-8]。应注意,通过使用如上所述的DCFH在荧光光谱分析中所获得的来自对照实验的数据(在图6A至图6F的插图中显示)与根据纳米线材的生物传感器检测的观察结果一致。

[0630] 癌细胞通过高速糖酵解产生能量,并且与正常组织相比,分泌更多乳酸,这种现象称为“Warburg效应”。因此,细胞外乳酸是细胞代谢活动的重要指标。

[0631] 研究了2DG处理的Jurkat细胞的细胞外乳酸水平与24小时后所得细胞增殖率之间的相关性。获得的数据显示在图6F中,并显示2DG处理的Jurkat细胞的细胞乳酸分泌减少,并且细胞具有降低的增殖速率。这与之前的研究结论一致,即使用2DG抑制糖酵解可以上调(upregulate)受死亡受体诱导(death receptor-induced)的细胞凋亡[radelli等人所著Oncogene 2010,29(11):1641-1652]。

[0632] 此外,进行药物处理的Jurkat细胞的pH值传感,并且获得的数据显示在图6C和图6G中。如其中所示,所有培养细胞的pH值随时间变为更酸性,而2DG处理的细胞的pH值比对照组更为碱性(参见图6G),可能是由于乳酸分泌减少(如图6F所示)。由于乳酸的 $pK_a$ 为3.9,因此在生理pH值下将其解离成乳酸根阴离子和质子。因此,与对照相比,2DG处理的Jurkat细胞的乳酸分泌减少对细胞外酸化的影响较小。

[0633] 图6H和图6I分别显示了MTX处理的样品和2GD处理的样品的细胞活力,证实药物的抗增殖活性(anti-proliferative activity)。

[0634] 使用原代人类B细胞进行感知:

[0635] 监测慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia,CLL)细胞和正常B细胞的代谢水平24小时,并测定代谢显著性。

[0636] 首先通过活细胞的数量将测量的CLL细胞的代谢水平标准化,然后通过正常B细胞的代谢水平进一步标准化。获得的数据显示在图7A中,并显示CLL细胞的ROS水平和乳酸水平高于正常B细胞的ROS水平和乳酸水平。这些发现与先前的研究一致,表明癌细胞比正常细胞产生更高水平的 $H_2O_2$ [Szatrowski和Nathan CF所著Cancer Res 1991,51(3):794-798; Zieba所著Respiratory medicine 2000,94(8):800-805]。

[0637] 所述结果还证实了与正常组织相比,癌细胞分泌更多乳酸的假设。

[0638] 所述数据进一步暗示氧化还原反应性纳米线材生物传感器将在治疗期间估计癌

细胞的代谢变化以实现个性化医疗。

[0639] 图7A和图7B显示测试样品的CLL细胞(图7A)和细胞活力(图7B)的病理学特征。值得注意的是,CLL细胞的ROS水平和乳酸水平高于正常B细胞。

[0640] 下表1显示了CLL细胞的生物学参数。

[0641] 表1:

[0642]

CLL 病患 编号	性 别	年 龄	白血 球 ( $10^9/L$ )	淋 巴 细 胞 (%)	血 红 蛋 白 (g/d L)	血小 板 ( $10^9/L$ )	Rai 阶 段	$\beta_2$ 微 球蛋 白 (mg/d L)	细胞 遗传 学	之 前 的 处 理
1	M	7 8	18090	81	12. 8	1200 00	I	2.3		无
2	F	7 6	97000	93	13. 2	1710 00	II		正常	瘤可 宁 (leuk eran)

[0643] 例5:

[0644] 电控装置(Electrically Controllable Device):

[0645] 根据本发明的一些实施例,制造并操作原型的氧化还原反应性纳米线材传感器装置。

[0646] 纳米线材传感器的表面被氧化还原可逆基团9,10-二羟基蒽(9,10-dihydroxyanthracene)共价修饰。通过施加化学品或电压可以确保9,10-二羟基蒽和9,10-蒽醌(9,10-anthraquinone)之间的可逆转化。选择9,10-二羟基蒽/9,10-蒽醌的氧化还原可逆系统作为传感机团,因为在代谢产物,如 $H_2O_2$ 和活性氧物质存在下,9,10-二羟基蒽会迅速氧化。转化为9,10-蒽醌。另一方面,在还原剂存在下,如N,N-二乙基羟胺,或通过施加电压,水溶液中的9,10-蒽醌可以可逆地还原为9,10-二羟基蒽。因此,通过一短连接物(short linker)将所述氧化还原系统与SiNW FET阵列表面共价连接,实现一氧化还原反应性SiNW FET纳米装置。

[0647] 9,10-二羟基蒽倾向于与氧反应性物质(oxygen reactive species,ROS)或与 $H_2O_2$ 反应。ROS和 $H_2O_2$ 都是细胞代谢的产物。此外, $H_2O_2$ 是来自氧化酶家族的酵素的代谢产物。因此,通过向特定氧化酶(例如但不限于葡萄糖氧化酶)引入代谢物(例如但不限于葡萄糖),选择性地产生 $H_2O_2$ 。ROS或 $H_2O_2$ 选择性地氧化纳米线材场效应晶体管(FET)表面上的9,10-二羟基蒽,结果改变纳米线材表面上的电荷密度并改变装置的导电性。

[0648] 经修饰的基团的可逆氧化还原性质可用于任选且优选地连续测量代谢活性。通过

控制调节纳米线材装置上的电流的电子/电荷密度,可以控制可被ROS和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化的基团的量(在本实施例中为9,10-二羟基蒽基团)。例如,通过改变栅极电压,可以调节纳米线材上的电荷密度。在本发明的一些实施例中,通过施加恒定的栅极电压,在纳米线材表面上保持恒定的9,10-二羟基蒽的群体(population)。在这些实施例中,栅极电压与纳米线材表面上的9,10-二羟基蒽基团之间存在平衡。通过向系统中添加ROS或H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,由于存在氧化物质,所述平衡发生变化。氧化物质的存在减少了纳米线材表面上的9,10-二羟基蒽的数量,导致装置的电导率发生变化。

[0649] 本实施例的装置的优点在于其允许在单一纳米线材装置上直接分析生物样品,用于选择性地检测特定代谢物,而不需耗费时间和金钱的步骤,例如标记和纯化。

[0650] 通过操作所述制造的原型装置,本发明人成功地展示了在没有预处理的情况下在生理溶液中连续传感代谢物。通常H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和代谢物的浓度依赖性传感涉及生理浓度范围。

[0651] 本发明人发现,对于实际应用,例如但不限于体内传感,特别是当需要测量精确量的代谢物时(例如对糖尿病的连续葡萄糖监测),如果在安装或植入生物体内时,为传感器装置建立校准曲线不是不可能的,但这是有困难的。本发明人发现,本实施例的电控装置可以自行校准。优选地,这是使用相同装置或芯片或平台上的纳米线材FET阵列来实现的。一些纳米线材FET装置仅用非氧化还原活性基团(non redox active moiety)来修饰。因为从体内环境到非氧化还原活性基团所修饰的纳米线材表面没有特定的氧化反应,所以来自非氧化还原活性基团所修饰的纳米线材的信号被定义为背景。可以通过从来自氧化还原活性基团所修饰的纳米线的信号中减去背景来确定代谢物的量。

[0652] 图12和图13A至图13E显示根据本发明的一些实施例中20纳米直径的P型SiNW-FET装置的制造工艺,于具有600纳米氧化物层的3英寸硅晶圆上。通过化学气相沉积(chemical vapor deposition,CVD)系统,通过汽液固体(vapor liquid solid,VLS)工艺合成P型SiNW(图13A)。将p型SiNW沉积在具有600纳米的氧化物层和外部金属焊盘(outer metal pads,5纳米铬(Cr),然后60纳米金(Au))的硅衬底上,其通过光刻(lithography)预先制造(图13B)。使用由500纳米LOR5A(Microchem)和500纳米1805(Shipley)组成的多层光阻结构,而沉积源极和漏极。在电极图案的曝光和显影之后(图13C),分别通过电子束和镍(60纳米)的热蒸发使触点金属化,然后用Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>(60纳米厚)的绝缘层钝化,在80℃下,以等离子体增强化学气相沉积(plasma-enhanced chemical vapor deposition,ICP-PECVD,Axic Inc.)和10纳米氧化铝层(使用Cambridge Nanotech Savannah 200系统的ALD沉积)进行沉积所述绝缘层(图13D)。执行未曝光的光阻层的剥离以及SiNW和金属触点的热退火(图13E)。每个FET的源极和漏极之间的间隔约为2微米。

[0653] 图14A至图14F显示表面修饰(图14A至图14C)和氧化还原反应性SiNWFET的表征(图14D至图14F)。如图所示。用胺基团对SiNW活化表面进行硅烷化(silanization,图14A至图14B),形成连接9,10-蒽醌基团与被修饰的表面的磺酰胺键(sulfonamide bond,图14B至图14C)。如图14D至图14F所示,是修饰表面的碳(C)、氮(N)和硫(S)的XPS光谱和原子组成。图14D至图14F的XPS光谱分别对应于图14A至图14C的修改阶段。

[0654] 图15显示通过栅极的电化学还原和通过氧化还原活性纳米线材装置上的还原剂的化学还原之间的比较。在打开负栅极电压2分钟后,电流下降。当氧化还原活性纳米线材装置被还原剂还原时,也观察到这种现象。实验条件是:0.3V的源-漏电压,在磷酸盐缓冲液

(155毫摩尔浓度, pH=7.45) 中进行测量, 纳米线材装置被磷酸盐缓冲液中1毫摩尔浓度的 $H_2O_2$ 溶液完全氧化。纳米线装置在磷酸盐盐水缓冲液中被1体积百分浓度的N,N-二乙基羟胺(N,N-Diethylhydroxylamine, 还原剂) 完全还原。当纳米线上没有电流时, 源极-漏极电压为0.0V。

[0655] 图16A和图16B显示非氧化还原活性物质(图16B) 和氧化还原活性物质(图16A) 基团所修饰的纳米线材装置之间的比较。非氧化还原活性装置仅用(3-氨基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷((3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane) 修饰。在氧化还原活性修饰的情况下, 在接通负栅极电压3分钟后, 存在电流下降, 显示还原过程。在非氧化还原活性修饰装置的情况下未观察到这种现象。实验条件是: 0.3V的源-漏电压, 在磷酸盐缓冲液(155毫摩尔浓度, pH=7.45) 中进行测量, 在开始测量之前, 纳米线材装置被磷酸盐缓冲液中的1毫摩尔浓度的 $H_2O_2$ 溶液完全氧化。

[0656] 图17A和图17B显示使用氧化还原活性修饰的纳米线材装置传感磷酸盐缓冲盐水中的葡萄糖。最初, 将葡萄糖氧化酶(50微克/毫升) 与含葡萄糖的样品一起温育10分钟。然后通过管道和PDMS通道注入样品。从修饰的纳米线装置所获得的信号是浓度依赖性的。实验条件为源-漏电压为0.3V, 栅极电压为-0.9V。在注入新样品(800微升样品, 速率=100微升/秒) 之前, 关闭装置(源-漏电压0伏)。打开装置180秒后的电流值用于校准。

[0657] 图18显示使用氧化还原活性修饰的纳米线材装置在模拟的间质液中连续监测葡萄糖。最初, 将葡萄糖氧化酶(50微克/毫升) 与含葡萄糖的样品一起温育10分钟。然后, 使用流体输送系统以5微升/分钟的速率将样品引入装置中。从修饰的纳米线材装置获得的信号是浓度依赖性的并且是相关联的。实验条件为源-漏电压为0.3V, 栅极电压为-0.4V。模拟的间质液含有25%的牛血清和75%的磷酸盐缓冲盐水。

[0658] 示例6:

[0659] 根据本发明的一些实施例中, 已经制造了用于非侵入性监测多种排出的细胞外代谢物的一纳米装置。使用氧等离子体氧化SiNW表面, 以清洁和活化表面, 而用于随后的硅烷化过程。然后在干燥空气下(在氩气流下) 用(3-氨基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷((3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane), 覆盖SiNW的芯片, 以确保形成硅烷单层(silane monolayer), 由于考量德拜长度(Debye length), 在生理方案下这对于传感是有利的。与其他基于硅烷的修饰相比, 使用(3-氨基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷((3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane) 进行修饰的另一考量因素是产品在生理条件下的长期稳定性。

[0660] 根据XPS测量, 用(3-氨基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷((3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane) 修饰导致SiNW表面上氮原子的百分比增加, 这表明氨基硅烷衍生物的成功结合。然后在干燥氩气下将氨基修饰的SiNW FET引入9,10-蒽醌-2-磺酰氯(9,10-anthraquinone-2-sulfochloride) 的溶液中。选择干燥条件以防止磺酰氯基团(sulfochloride group) 通过水解而分解。磺酰氯基团(sulfochloride group) 与SiNW FET表面上的氨基反应形成共价高度稳定的磺酰胺键(sulfonamide bond), 使9,10-蒽醌(9,10-anthraquinone) 基团长期固定在SiNW FET表面上。根据XPS测量, 在9,10-蒽醌-2-磺酰氯(9,10-anthraquinone-2-sulfochloride) 修饰后, SiNW表面上的硫原子百分比增加, 这表明9,10-蒽醌基团的成功结合。

[0661] 材料和方法:

[0662] 硅纳米线材 (SiNWs) 通过化学气相沉积 (Chemical Vapor Deposition, CVD) 进行 p 型合成:

[0663] 20 纳米金纳米颗粒 (Ted Pella) 通过气-液-固 (VLS) 机制, 催化 Si NW 的生成。首先将这些纳米颗粒沉积在硅 (100) 生成基板上以限定 Si NW 生成的位点。为了帮助金纳米颗粒附着到硅基板上, 首先将聚-L-赖氨酸 (poly-L-lysine, Ted Pella) 引入硅晶圆, 并用作为一静电结合剂。通过施加 100W 和 0.200 托 (Torr) 的氧等离子体 5 分钟除去有机材料。接下来, 将晶圆 (wafer) 置于石英管炉 (quartz tube furnace) 中, 其中硅烷 ( $\text{SiH}_4$ ) 和乙硼烷 (diborane,  $\text{B}_2\text{H}_6$ , 100ppm 在  $\text{H}_2$  平衡气体中) 用作为硅纳米线材 (Si NW) 长成过程的反应物, 其中硼用作 p 型掺杂剂。硼/硅比为 1/4000。硅纳米线材生成速率约为 1 微米/分钟。

[0664] 硅晶圆上的硅纳米线材场效应晶体管阵列制造:

[0665] 通过光刻法制造硅纳米线材场效应晶体管 (SiNW-FET) 阵列, 参见图 12 和图 13A 至图 13E。通过光刻和铬/金 (5/60 纳米) 的蒸发分别制造外电极 (包括栅极) 之后, 硅纳米线材通过在乙醇中分散并在氧化物层上滴下 0.5 微升的液滴, 而沉积在晶圆上。将 p 型硅纳米线材沉积在 3 英寸硅晶圆上, 用 600 纳米热氧化物层 ( $<0.005$  欧姆/公分, SSP prime grade, Silicon Quest International) 覆盖。FET 的源极和漏极用多层光阻结构限定, 所述结构由 500 纳米 LOR5A (Microchem) 和 500 纳米 S1805 (Shipley) 组成。源极和漏极之间的间隙为 2 微米。在 MF319 显影剂中曝光和显影后, 将芯片浸入缓冲氧化物蚀刻剂 (氢氟酸/氟化铵比为 1/6) 溶液中 6 秒钟, 并立即通过电子束蒸发钛/钨/钛进行金属化 (5/60/10 纳米)。随后, 电极被 65 纳米的  $\text{Si}_3\text{N}_4$  层所绝缘, 所述  $\text{Si}_3\text{N}_4$  层在  $80^\circ\text{C}$  下通过等离子体增强化学气相沉积 (ICP-PECVD, Axic) 沉积, 以及被 10 纳米的氧化铝层所绝缘, 所述氧化铝层通过原子层沉积 (atomic layer deposition, ALD, Savannah, Cambridge Nanotech) 而制备。然后将芯片在 PG 去除剂 (或 N-甲基-2-吡咯烷酮, N-Methyl-2-pyrrolidone) 中剥离。通过在形成气体中退火 (氢氮比为 1/9), 通过一快速热处理器 (rapid thermal processor, RTP) 在  $380^\circ\text{C}$  下施加 2 分钟来结束 FET 装置的制造。

[0666] 采用水闸的 SiNW 装置的电表征:

[0667] 图 19A 和图 19B 显示在水闸配置下 p 型 SiNW FET 纳米装置的电特性。图 19A 是在不同栅极电压 ( $V_g$ ) 下的源-漏电流与源-漏电压 ( $V_{sd}$ ) 的曲线图。图 19B 是在 0.1V 源-漏电压 ( $V_g$ ) 下的源-漏电流与栅极电压 ( $V_g$ ) 的曲线图。

[0668] 在完成 SiNW FET 装置之前, 通过使用探针台 (probe station) 在去离子水中表征传感器芯片上的 SiNW 装置的电特性。使用源电压扫描, 装置活动的表征, 可选择允许满量 (full scale) 灵敏度的源-漏电压 ( $V_{sd}$ )。在固定的源电压上扫描栅电压 ( $V_g$ ) 可表征诸如载流子迁移率 (carrier mobility)、跨导 (transconductance) 和阈值电压 (threshold voltage) 的参数。基于这些测量, 选择性能最佳的装置并映射于未来的传感应用。

[0669] 扫描电子显微镜分析 (Scanning Electron Microscope Analysis):

[0670] 通过使用 Quanta 200 FEG 环境扫描电子显微镜 (ESEM) 分析合成的 p 型 SiNW 和 SiNW 装置的质量。图 20A 和图 20B 是 SiNW 的扫描电子显微镜 (SEM) 影像。图 20A 是通过硅 (100) 晶圆上的化学气相沉积系统合成的 20 纳米 p 型 SiNW 的 SEM 影像。图 20B 是 SiNW FET 装置的 SEM 影像, 其由连接到源极和漏极的 SiNW 组成。影像显示良好质量的合成纳米线材 (图 20A), 以及其成功组装到 FET 装置 (图 20B)。



[0671] 表面修饰:

[0672] 在制造SiNW FET阵列之后,用9,10-蒽醌-2-磺酰氯(9,10-anthraquinone-2-sulfochloride)进一步化学修饰芯片以进行细胞代谢物的传感。如下预合成修饰剂(modifying agent)。

[0673] 使用草酰氯(oxalyl chloride,0880,Sigma-Aldrich)和N,N-二甲基甲酰胺(227056,Sigma-Aldrich)于甲苯(244511,Sigma-Aldrich)中,将9,10-蒽醌-2-磺酸钠(sodium 9,10-anthraquinone-2-sulfonate,743038,Sigma-Aldrich)的磺酸盐基团(sulfonate)转化为磺酰氯(sulfochloride)。将蒽醌-2-磺酸钠(sodium anthraquinone-2-sulfonate,5克,0.0158摩尔)和甲苯(150毫升)的混合物置于250毫升圆底烧瓶中,所述烧瓶装有自动水分离器(Dean-Stark分水器)和冷凝器,混合物在回流下加热2小时以干燥反应混合物。然后将混合物冷却至60℃,加入草酰氯(6毫升)和N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide,2滴,约100微升)。将所得混合物在回流下加热8小时,然后蒸馏过量(30毫升)的甲苯和草酰氯的混合物。过滤收集氯化钠沉淀,减压下从滤液中除去溶剂。将固体残余物真空干燥过夜,得到蒽醌-2-磺酰氯(anthraquinone-2-sulfochloride,4.36克,90%产率)。

[0674] 为了将9,10-蒽醌-2-磺酰氯(9,10-anthraquinone-2-sulfochloride)与SiNW表面结合,首先用丙酮(acetone,9005-68,JTBaker),异丙醇(isopropanol,9079-05,JTBaker)和去离子水(deionized water,18MΩ)依序洗涤FET芯片。接着,进行氮气干燥。然后,施加氧等离子体(oxygen plasma,100瓦(W),0.2托(Torr))15分钟。将芯片用玻璃皿覆盖并在氩气下(无水和无氧)插入手套箱(150B-G,Mbraun)中以进行氨基硅烷修饰(amino-silane modification)。紧接着,用约150微升的(3-氨基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷((3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane,APDMES;SIA0603.0,Gelest)覆盖芯片60分钟。然后,用约30毫升的无水甲苯(244511,Sigma-Aldrich)洗涤芯片两次。将芯片从手套箱转移到洁净室并再次用异丙醇洗涤,然后氮气干燥。接下来,将芯片置于115℃的热板上25分钟。然后将芯片浸入混合物中,所述混合物含有50毫克的9,10-蒽醌-2-磺酰氯(9,10-anthraquinone-2-sulfochloride)、20毫升的无水甲苯(244511,Sigma-Aldrich)和1毫升的无水吡啶(anhydrous pyridine,270970,Sigma-Aldrich),在手套箱中在氩气(无水和无氧)下24小时,形成连接9,10-蒽醌(9,10-anthraquinone)基团和SiNW修饰表面的磺酰胺(sulfonamide)。

[0675] 质谱分析:

[0676] 使用质谱(Autospec M250Q,Waters Corp.USA)分析9,10-蒽醌-2-磺酰氯(用于SiNW表面修饰)作为确认磺酰氯(sulfochloride)基团形成。

[0677] X射线光电子能谱表面化学分析:

[0678] 在超高真空( $2.5 \times 10^{-10}$ 托(Torr)的基础压力)下进行X射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy,XPS)测量。用AlK $\alpha$ 单色光源(1486.6eV)照射样品,并通过球形电容分析仪以0.8毫米的狭缝孔径来分析结果电子。由于在测量期间样品略微带电荷,因此输入被数学校正,其中C1s在285eV处被用作为能量参考。所有测量均在25°的浅出射角(shallow take-off angle)下进行。在低能量范围窗口(low energy range window)中以高分辨率(通过能量=11.75eV,0.05eV/步骤)获得高分辨率多重光谱用于不同峰。这些测

量允许精确的能量位置和峰值形状决定,这是键结分析所必需的。

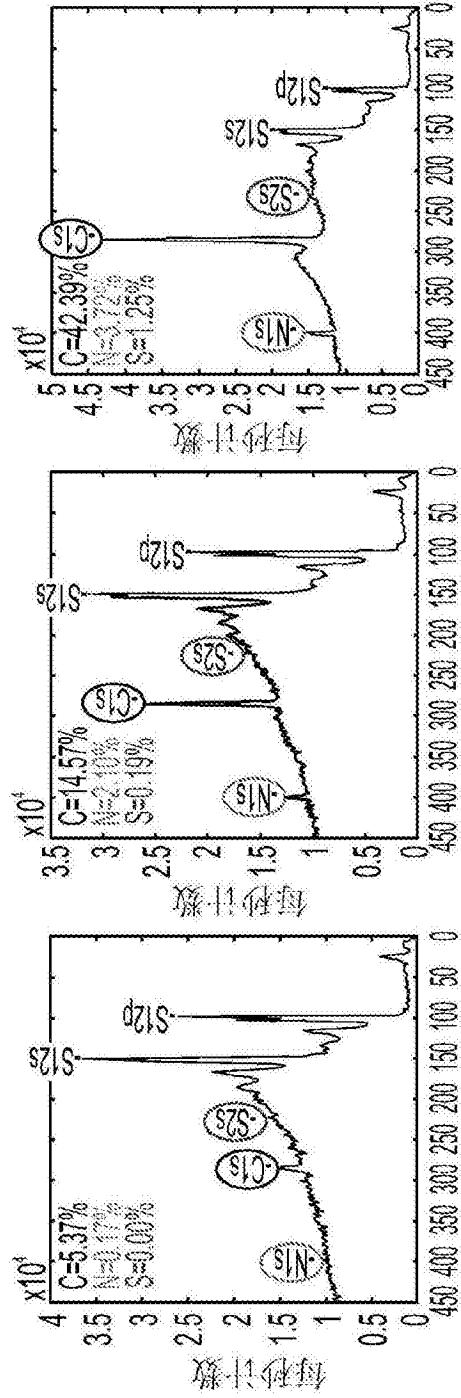
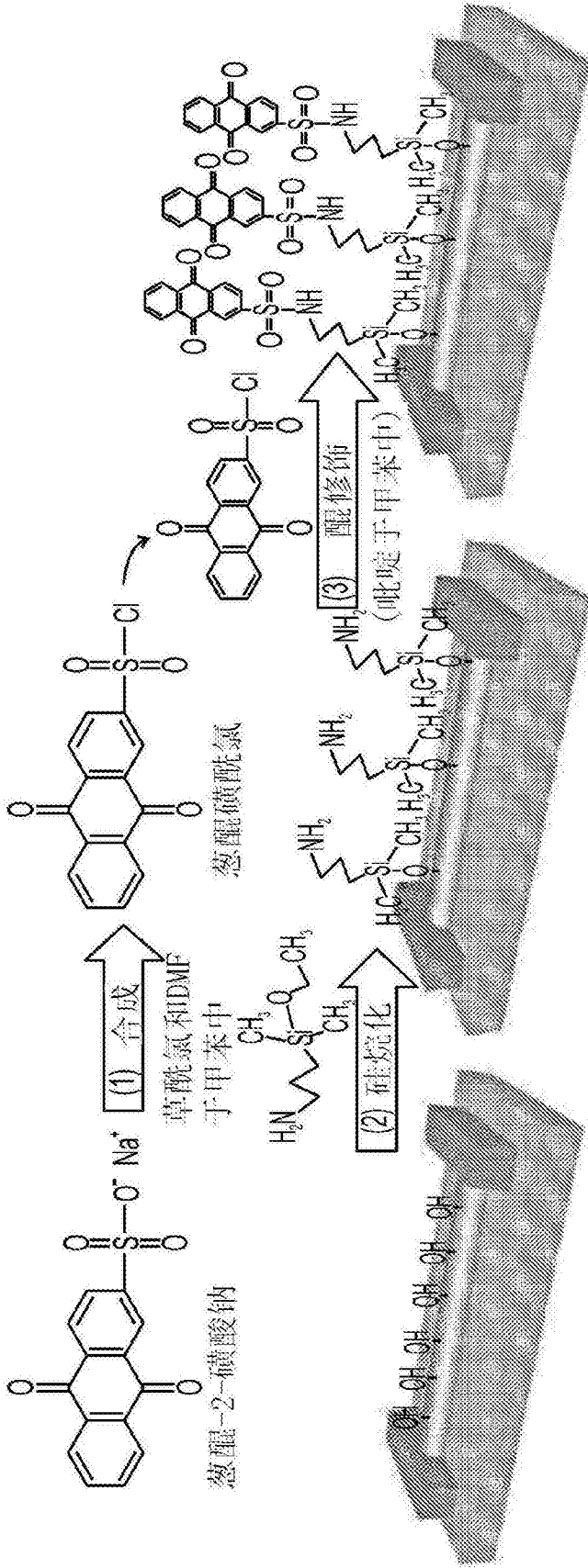
[0679] 流体输送系统 (Fluid-Delivery System) 的制造:

[0680] 将PDMS与固化剂以10:1的质量比在60℃下孵育过夜。然后将所得装置切成矩形片,尺寸为10×10×5毫米。上游聚乙烯管 (polyethylene tube, PE 20, Intramedic) 长14厘米、内径0.38毫米。下游Tygon管 (S-50-HL, Tygon) 长13厘米。

[0681] 虽然本发明结合其具体实施例而被描述,显而易见的是,许多替代、修改及变化对于那些本领域的技术人员将是显而易见的。因此,其意在包括落入所附权利要求书的范围内的所有替代、修改及变化。

[0682] 在本说明书中提及的所有出版物、专利及专利申请以其整体在此通过引用并入本说明书中。其程度如同各单独的出版物、专利或专利申请被具体及单独地指明而通过引用并入本文中。此外,所引用的或指出的任何参考文献不应被解释为承认这些参考文献可作为本发明的现有技术。本申请中标题部分在本文中用于使本说明书容易理解,而不应被解释为必要的限制。





结合能 (eV)

图 2C

结合能 (eV)

图 2B

结合能 (eV)

图 2A

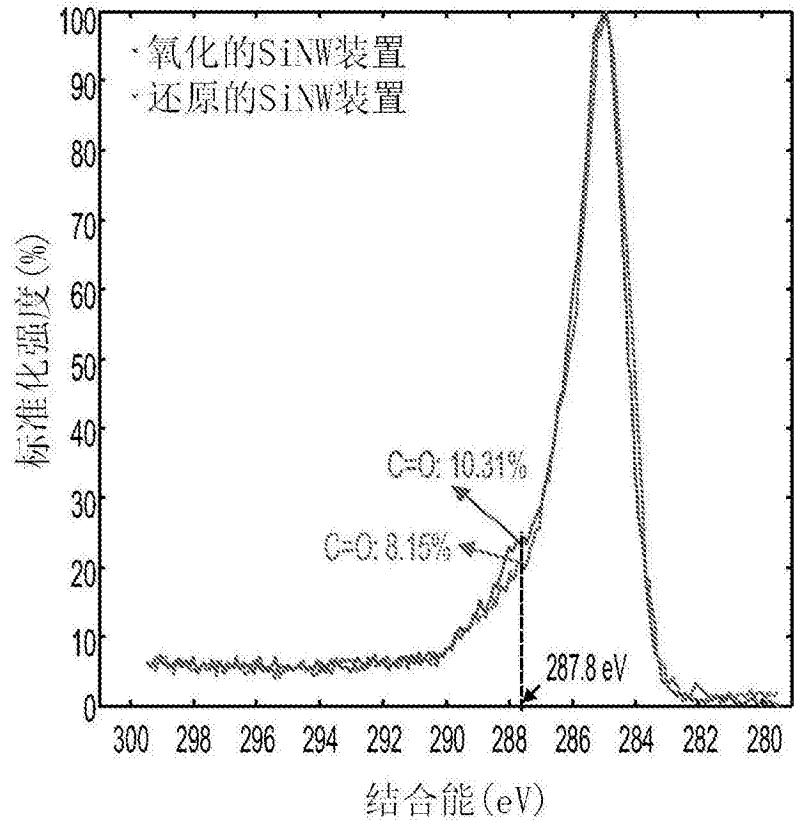


图2D

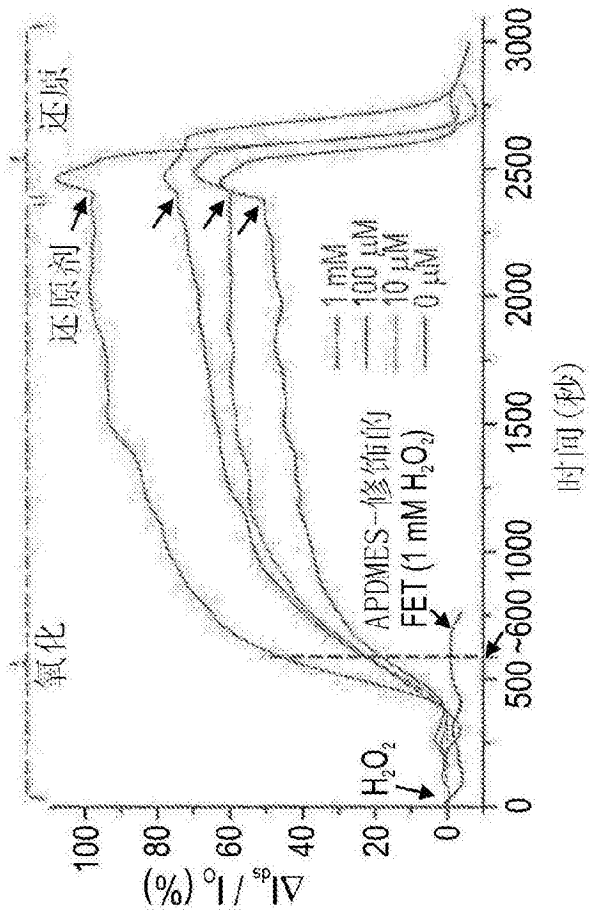
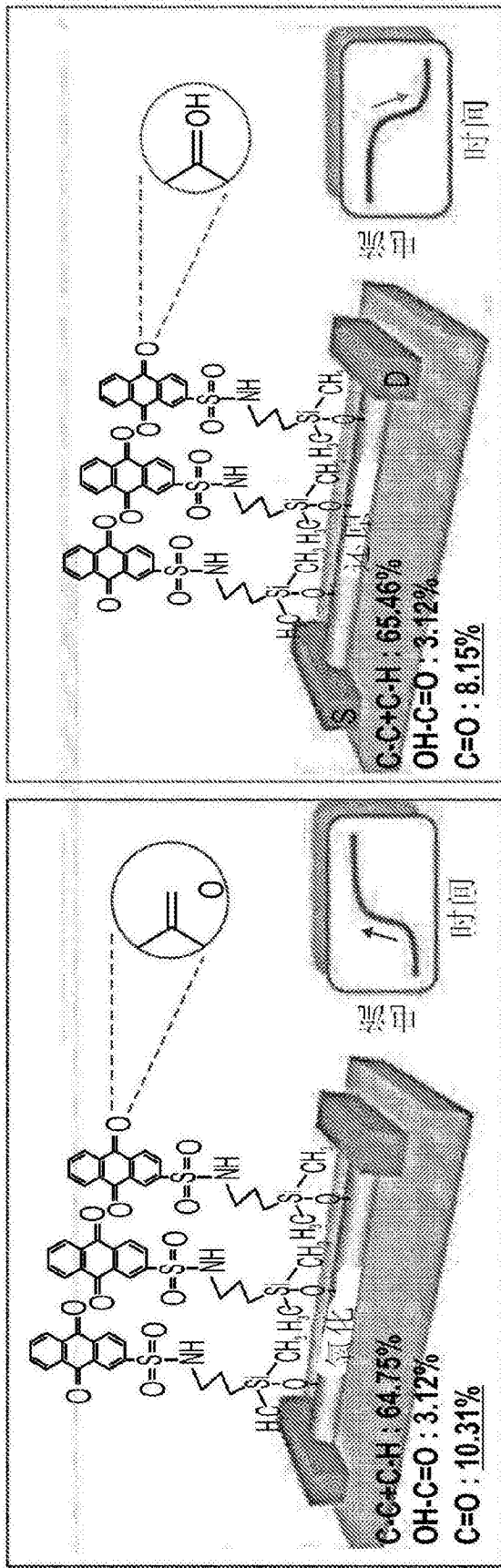


图3A

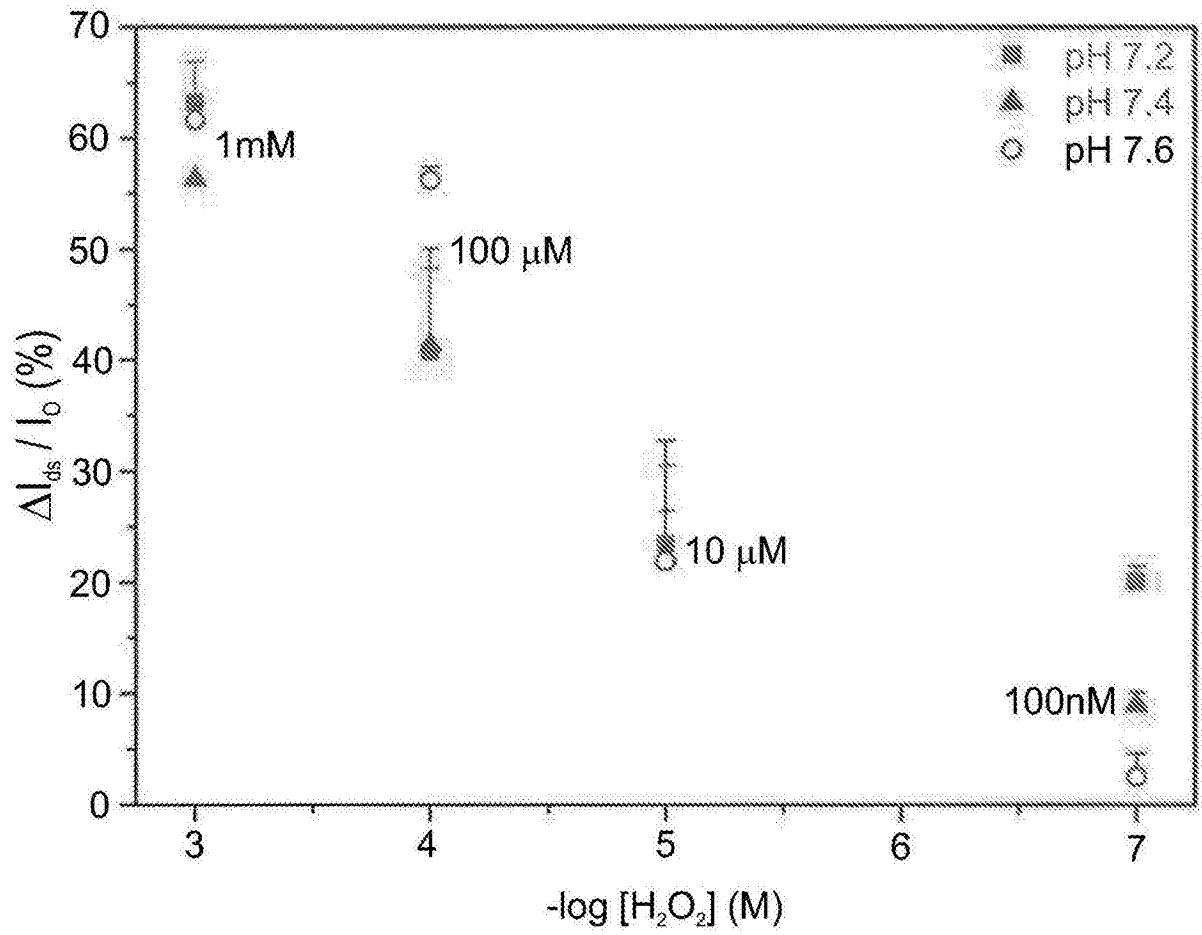


图3B

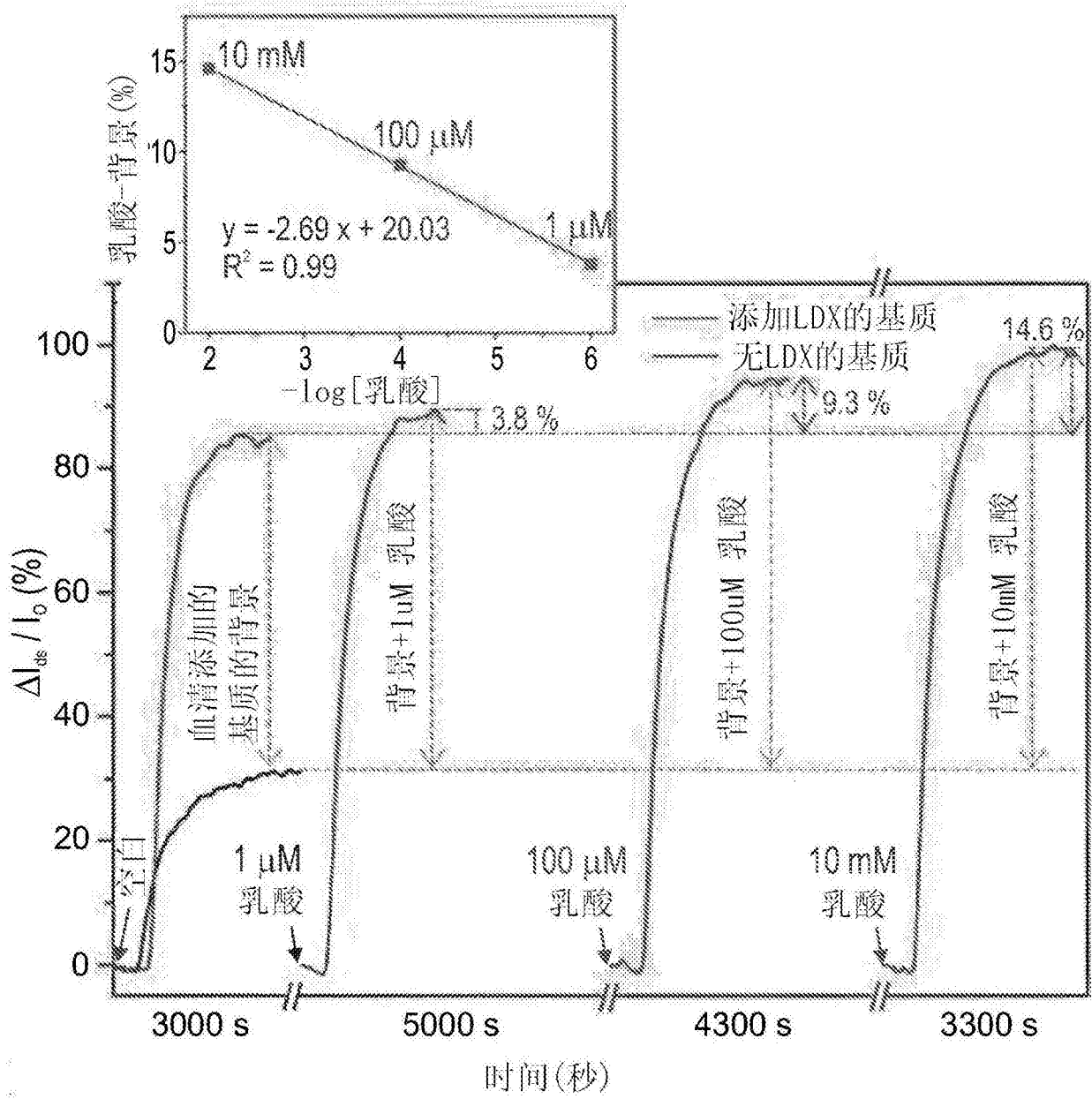


图4A



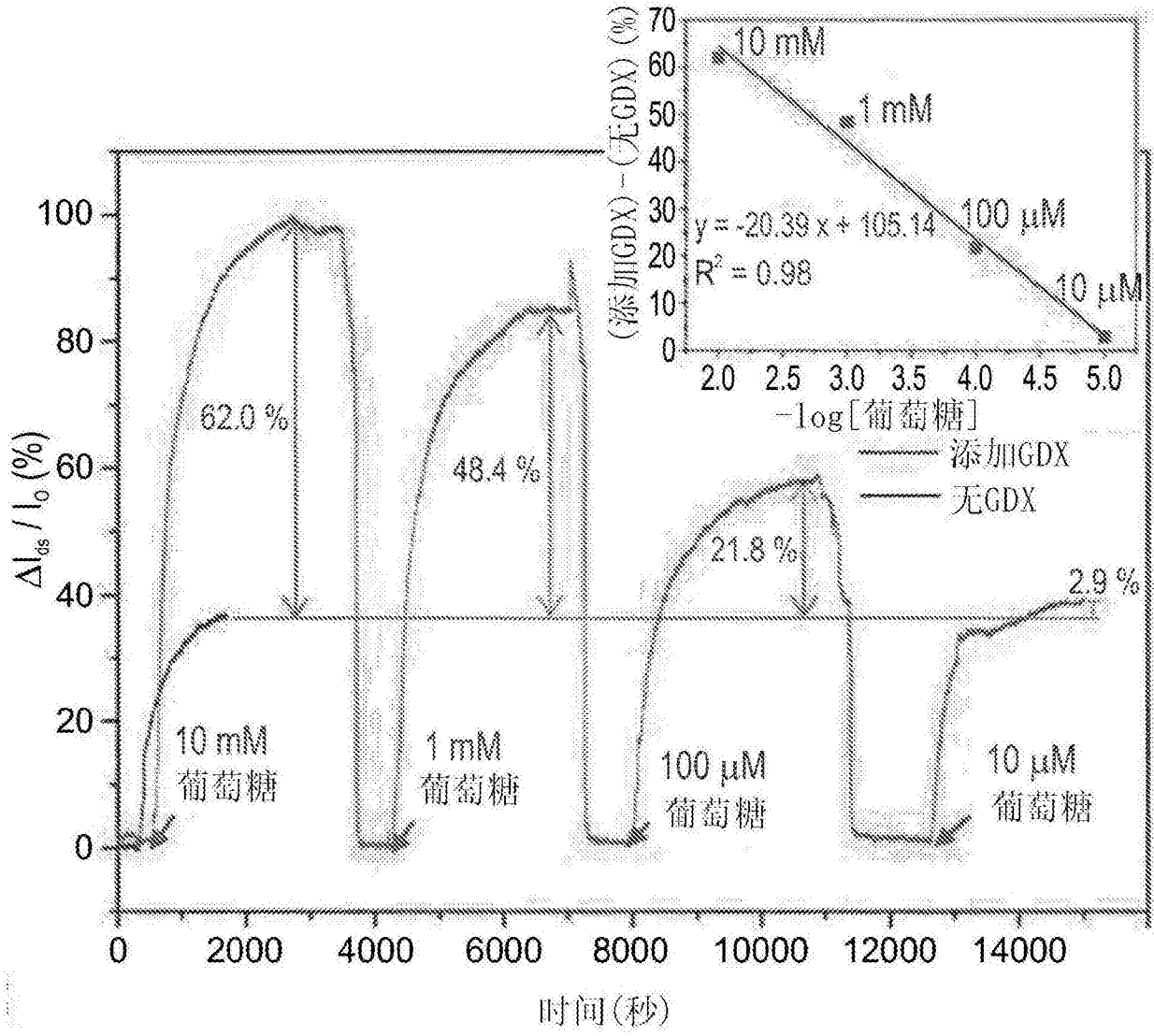


图4B

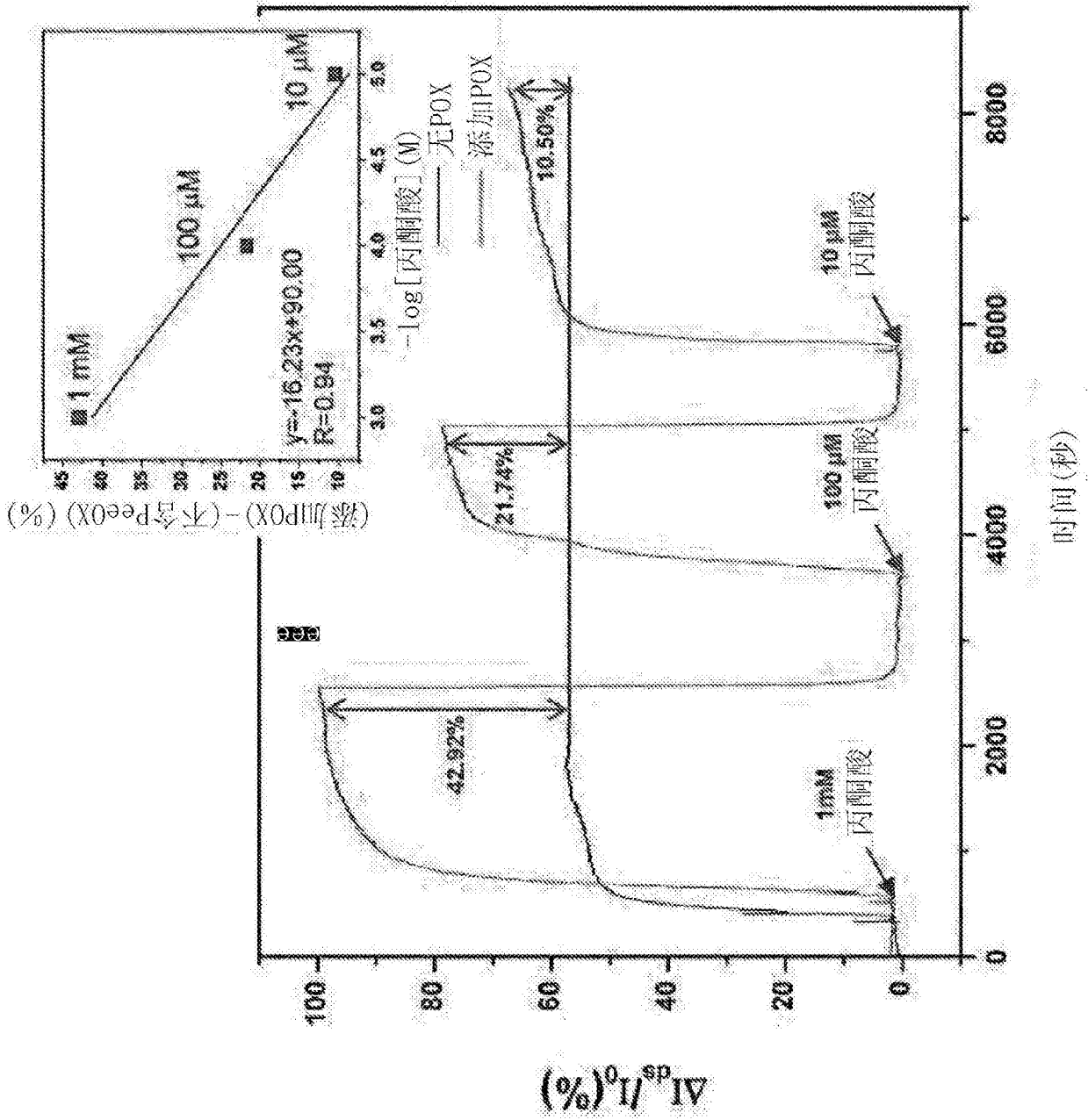


图4C

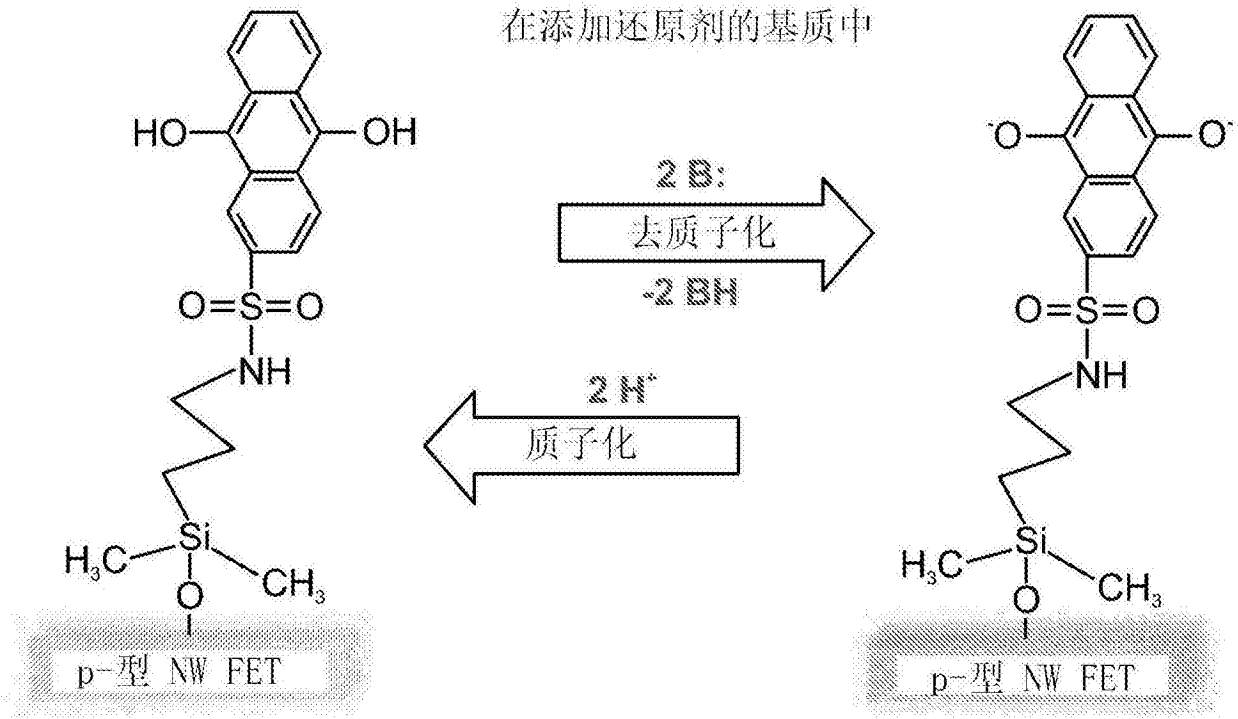


图5A

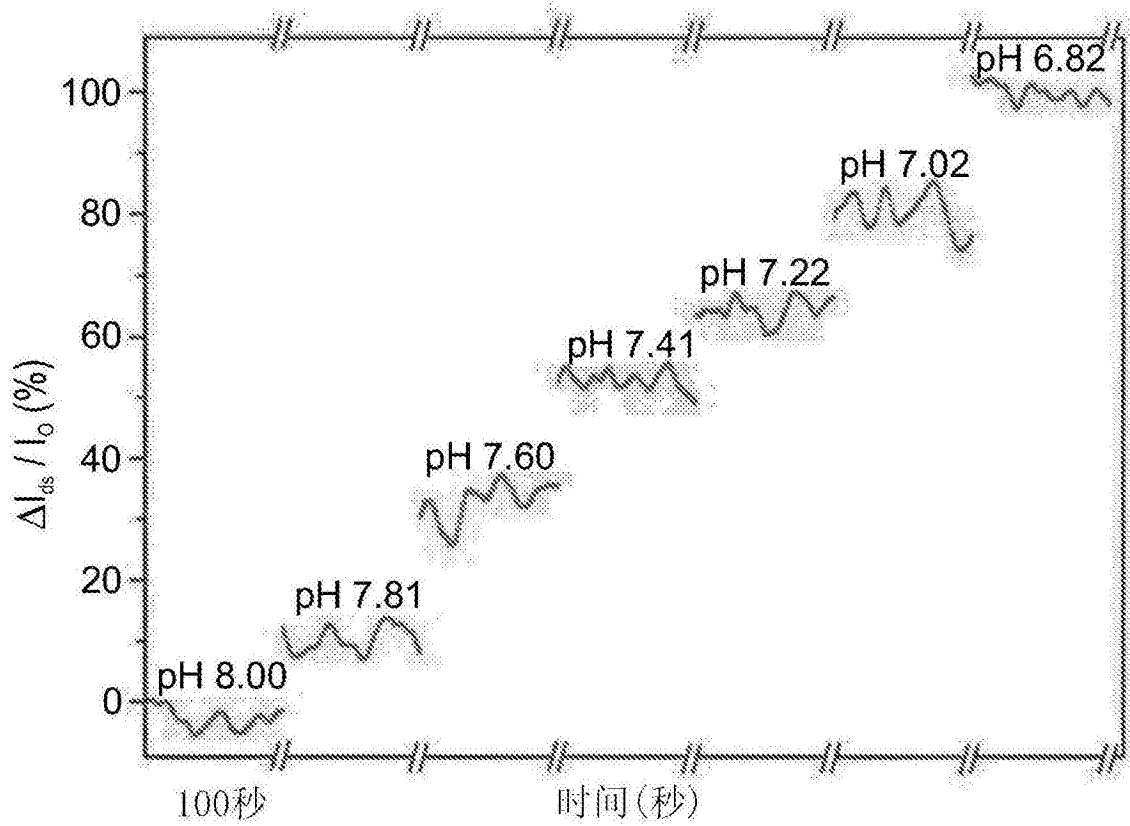


图5B

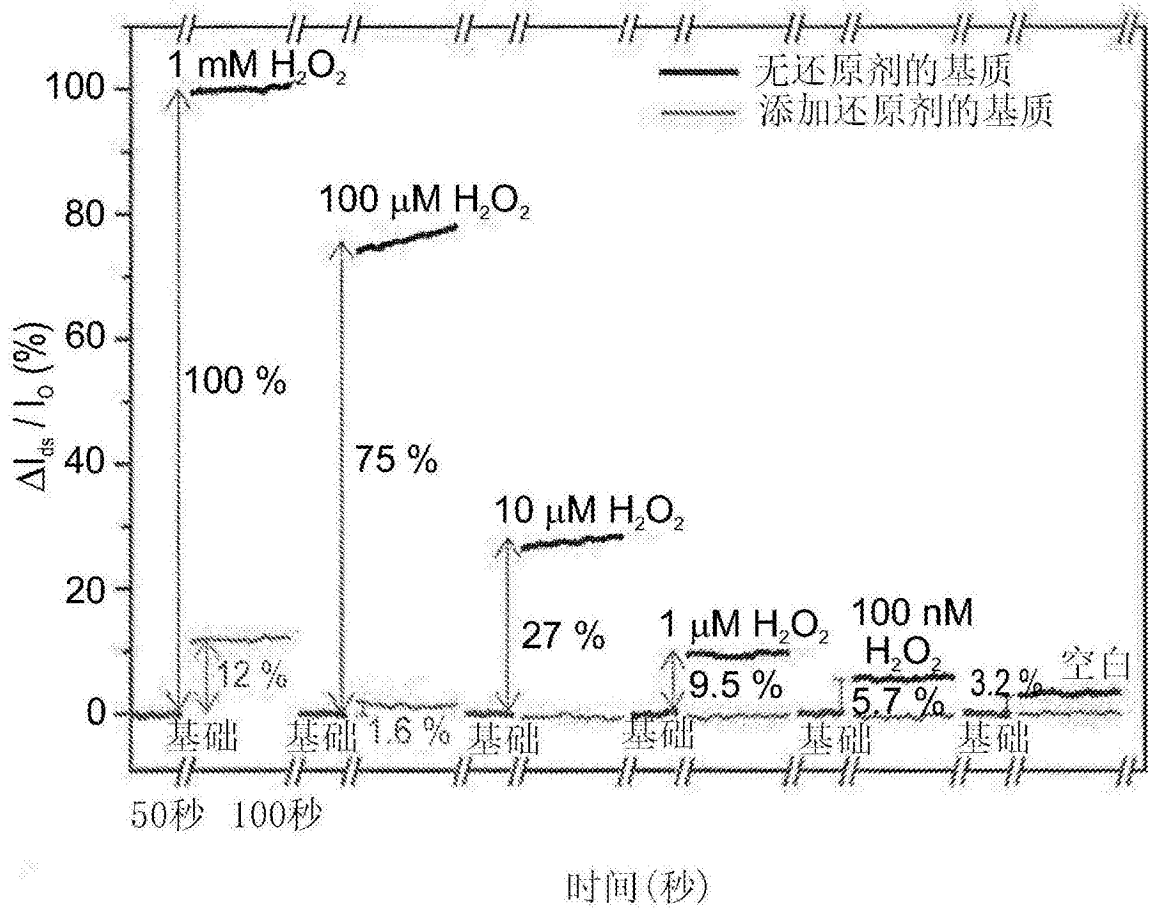


图5C

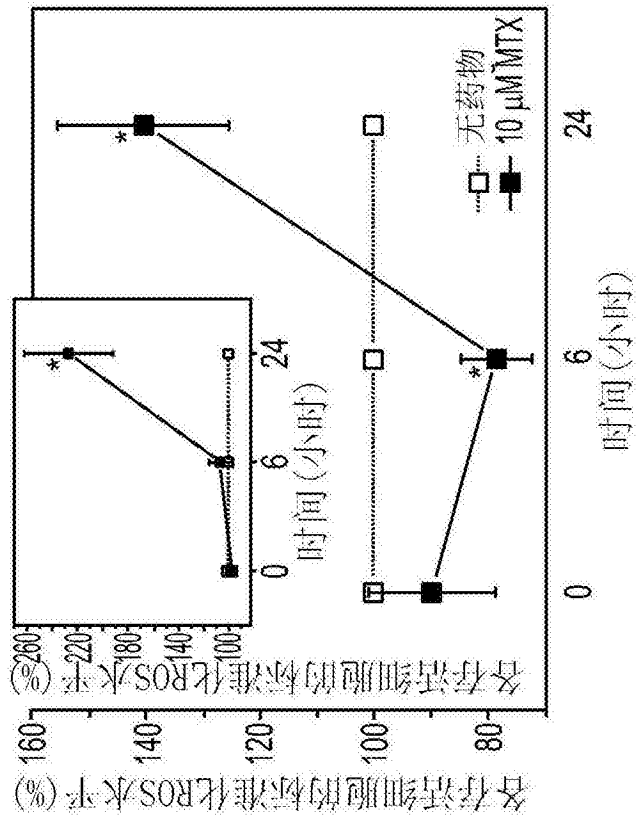


图6A



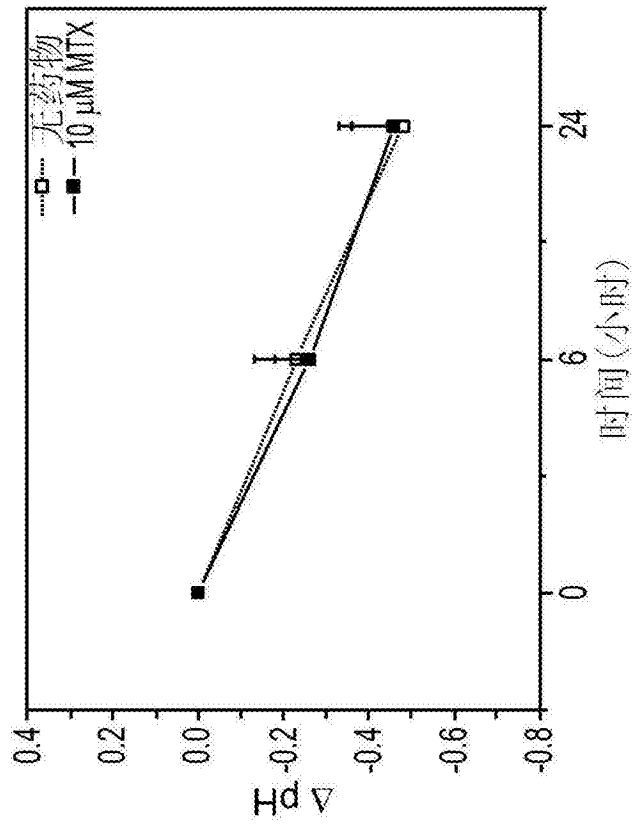


图6C

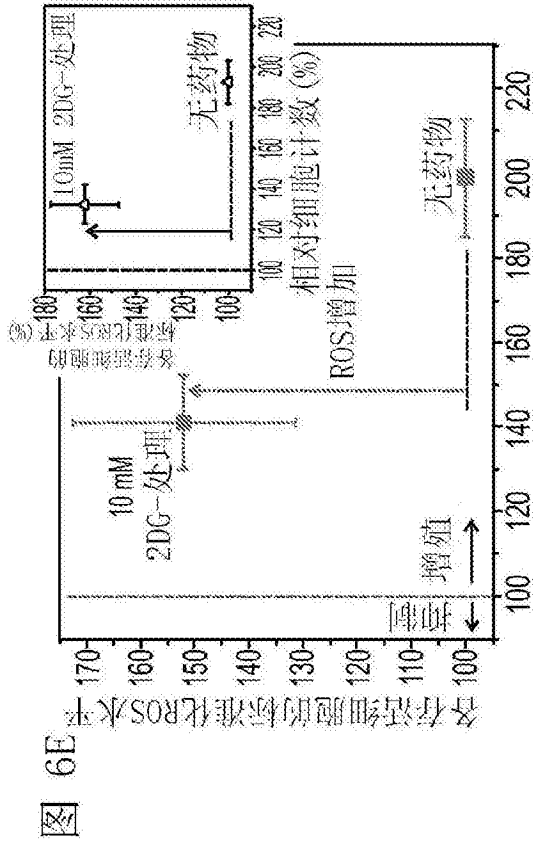


图 6E

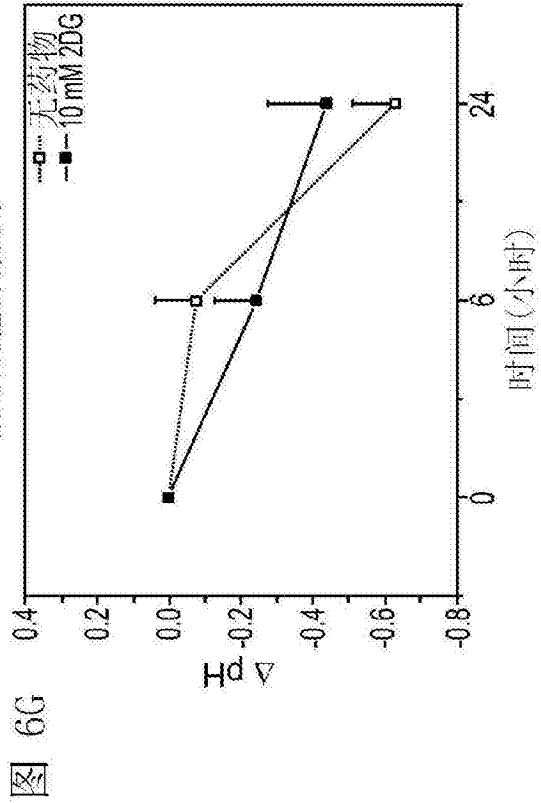


图 6G

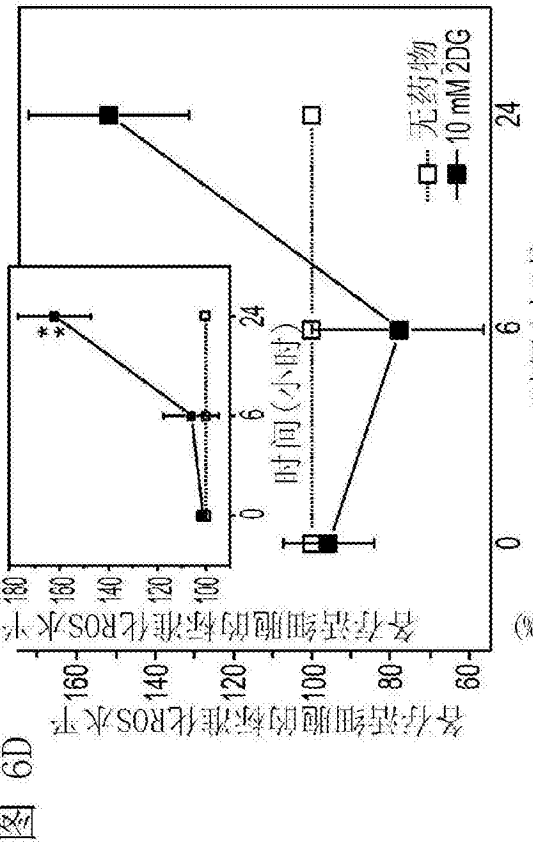


图 6D

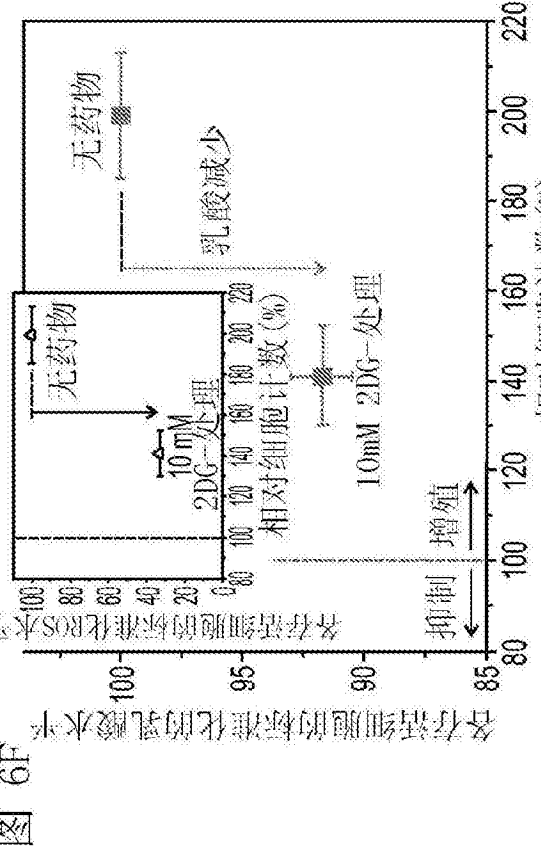


图 6F



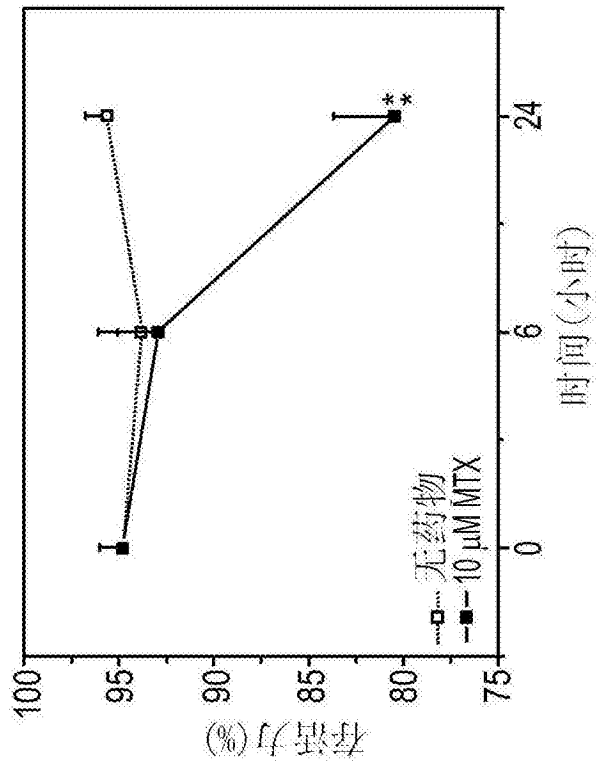


图6H

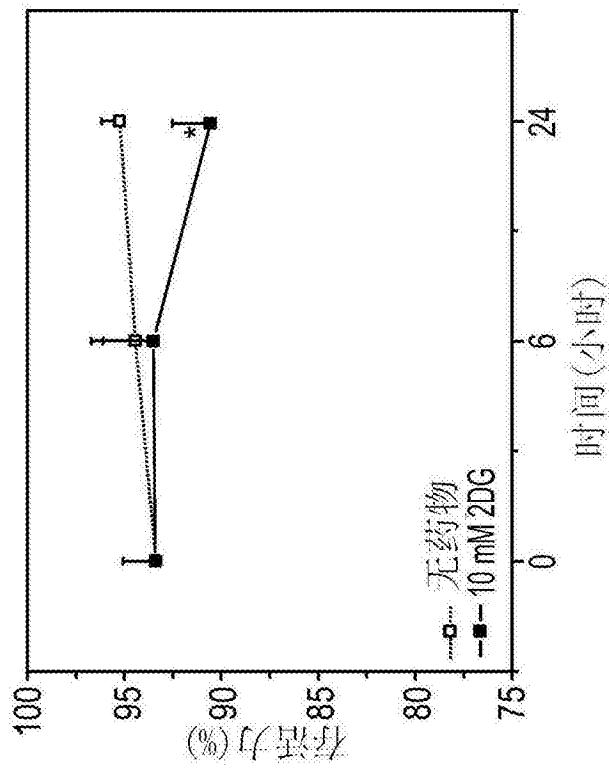


图6I

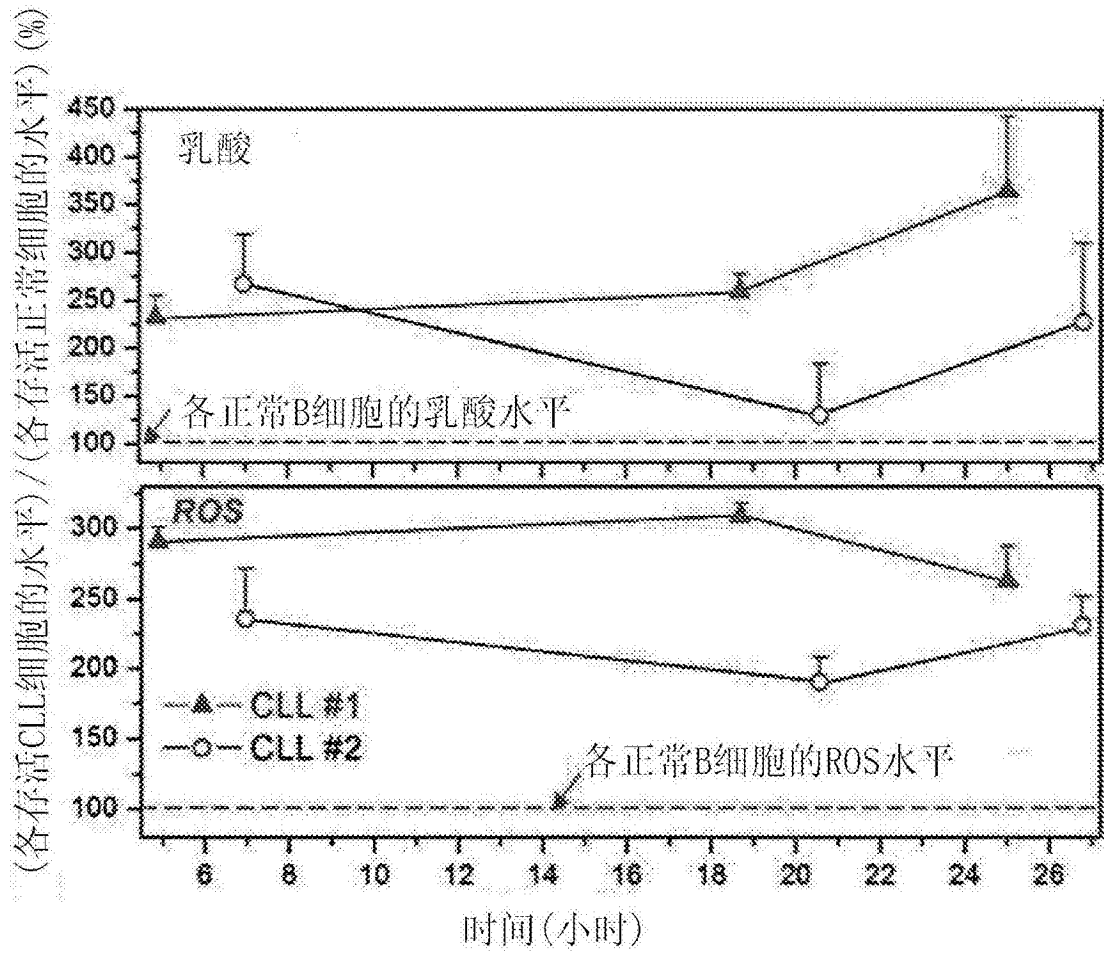


图7A

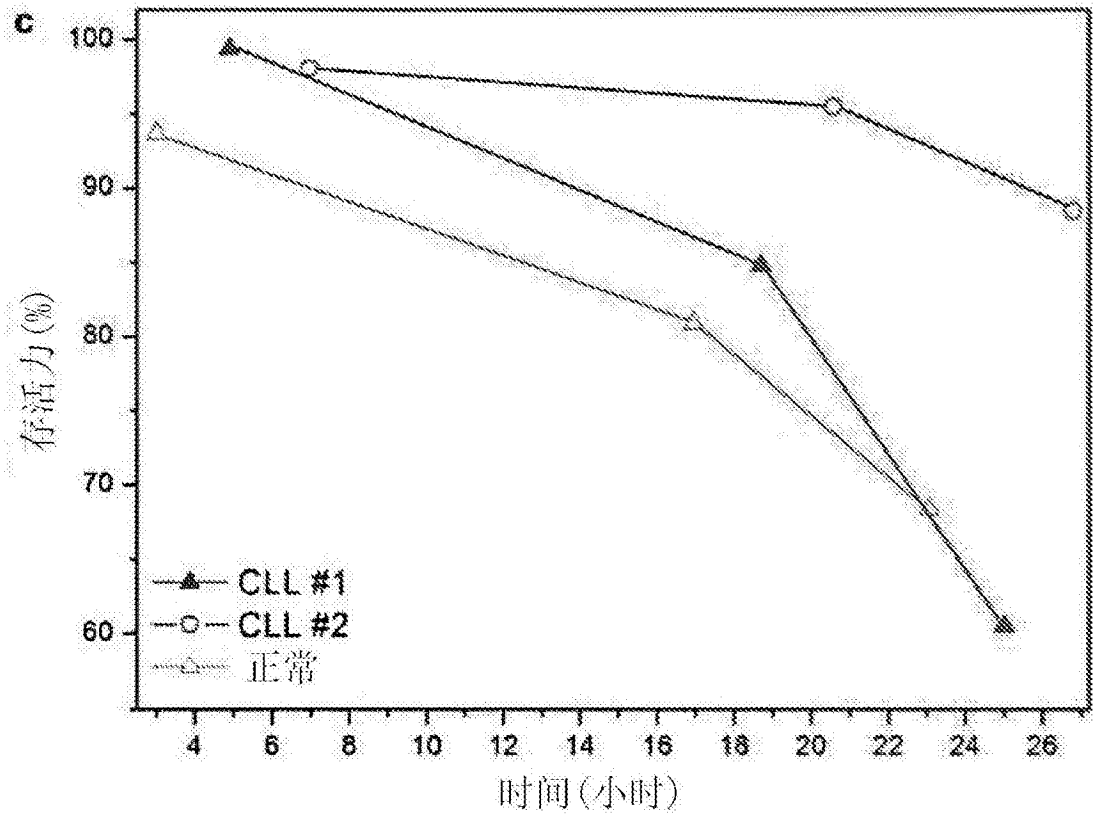
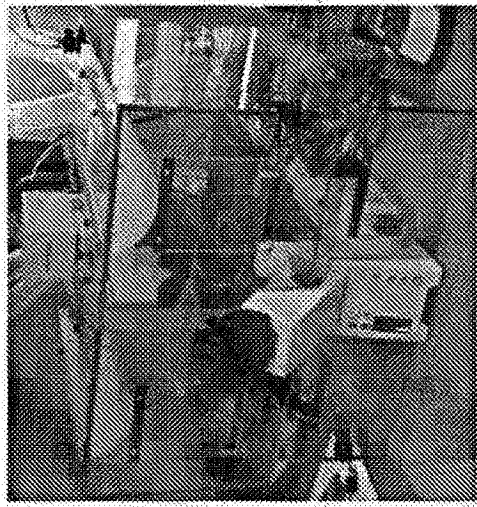
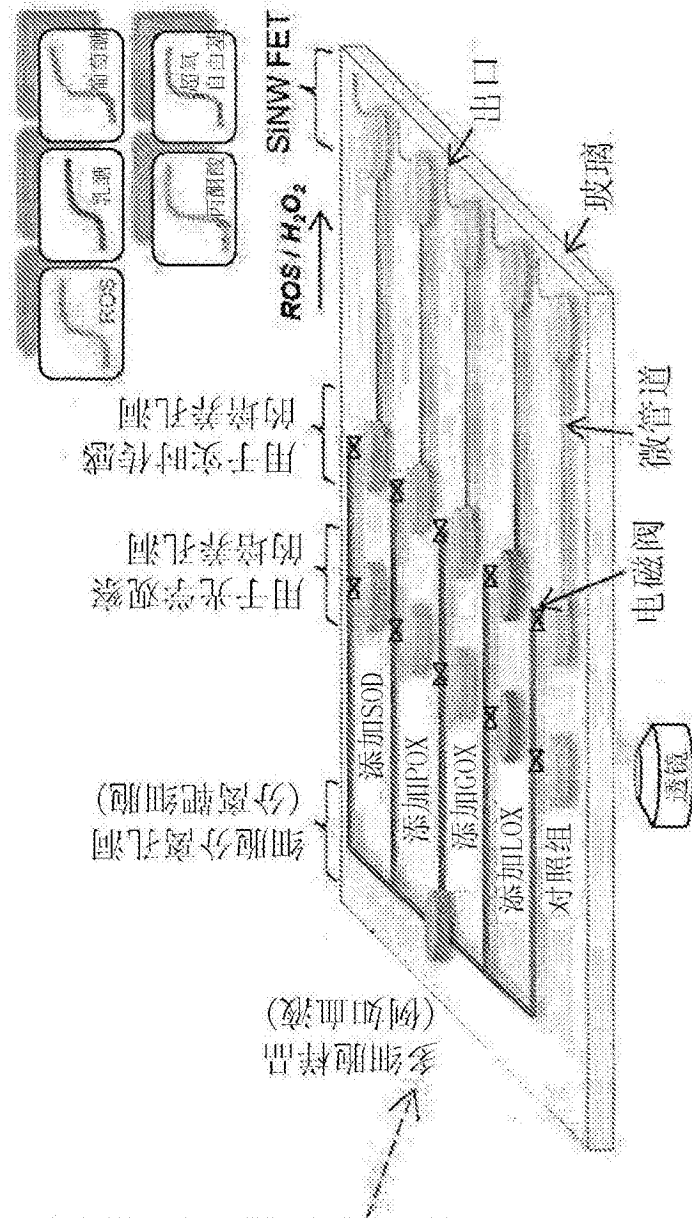


图7B



具有一台階上孵育器的显微镜

图8

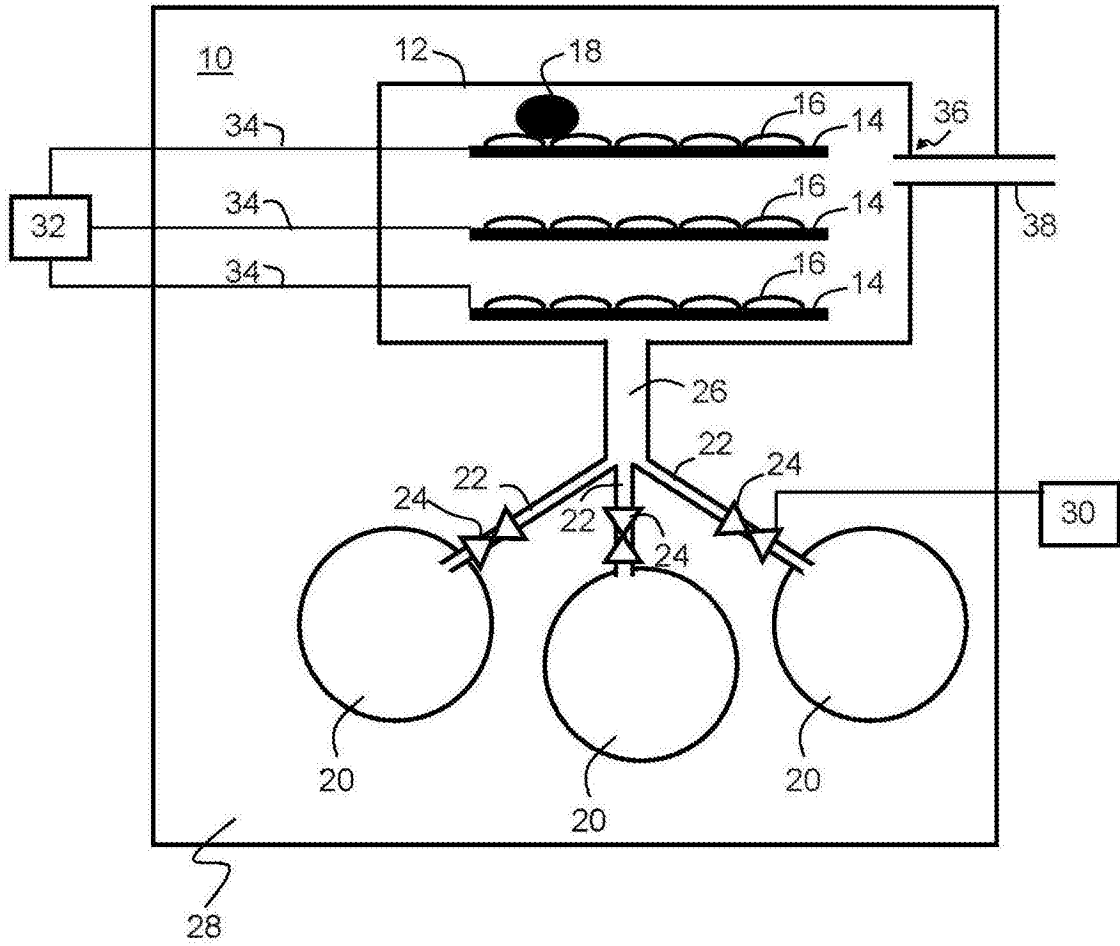


图9A

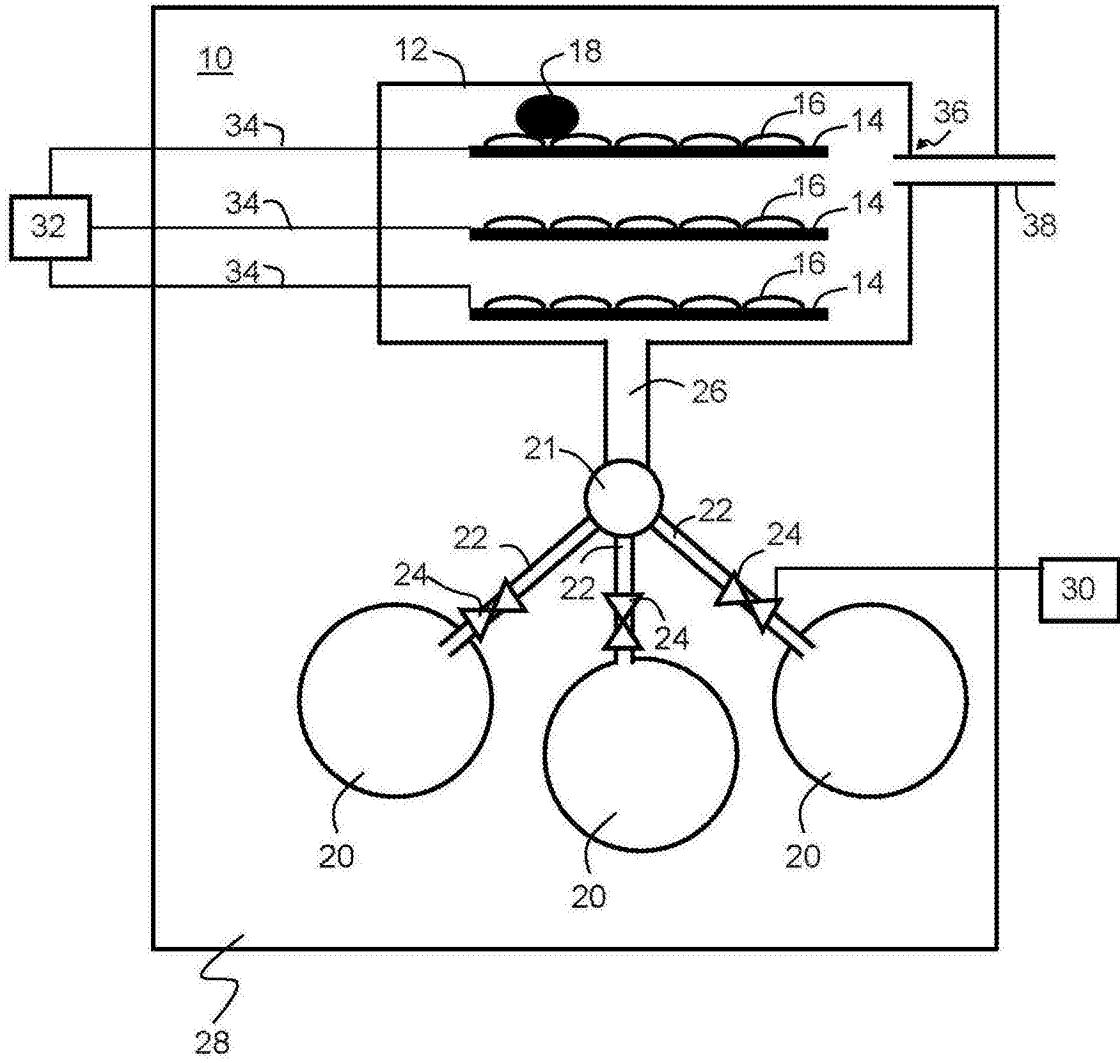


图9B

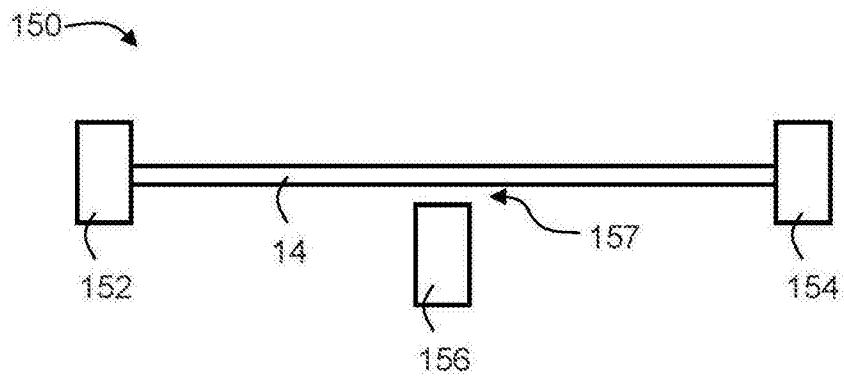


图10

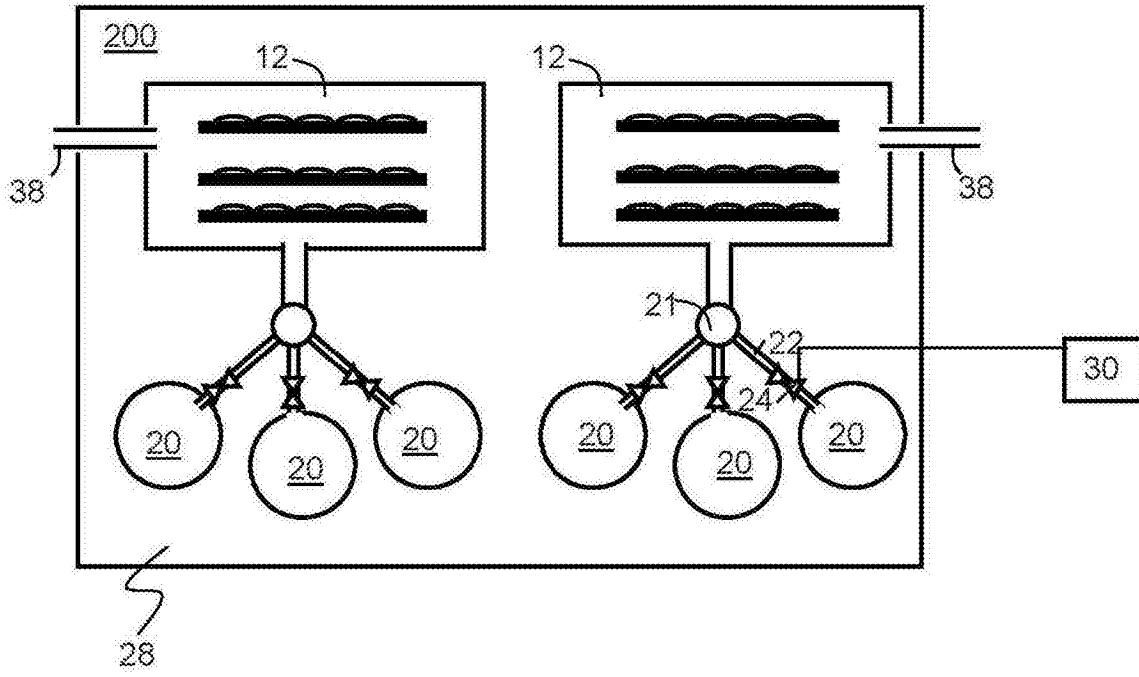


图11A

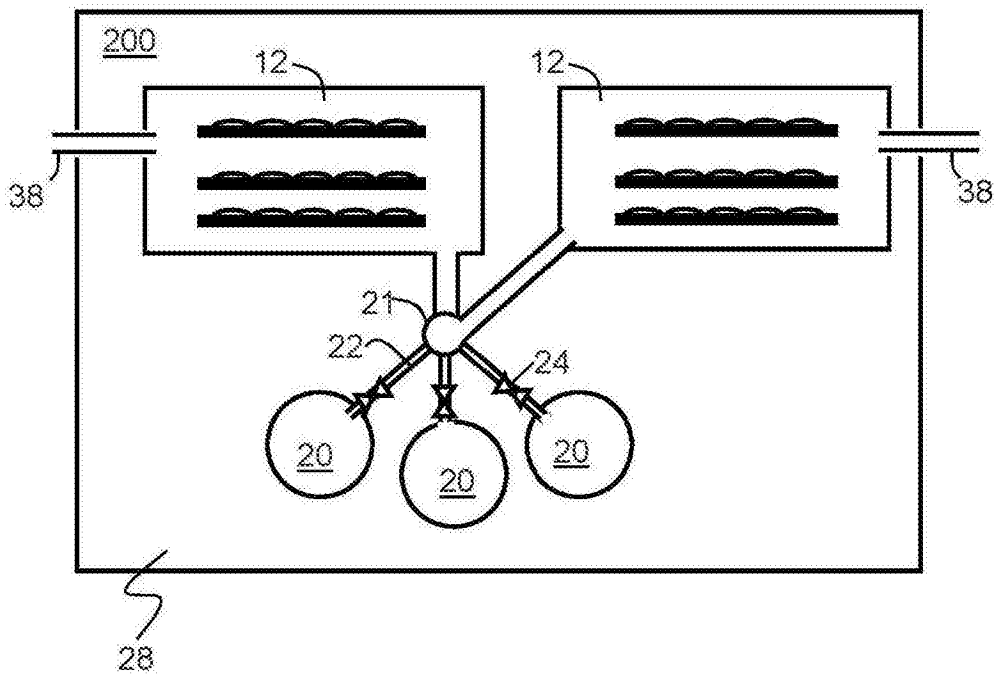


图11B

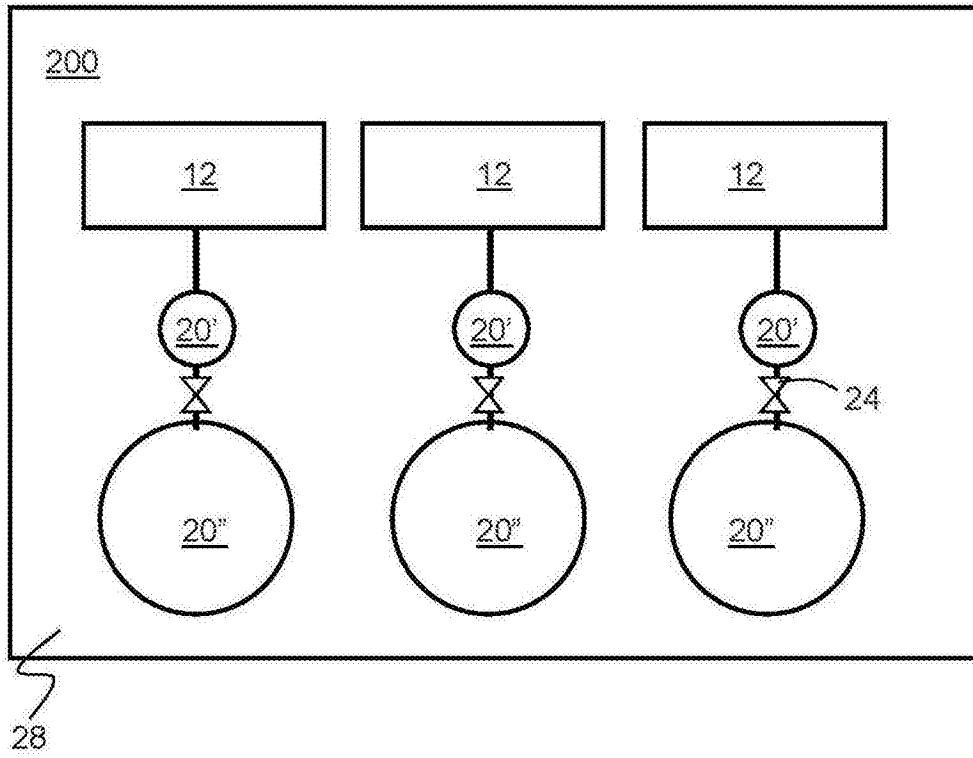


图11C

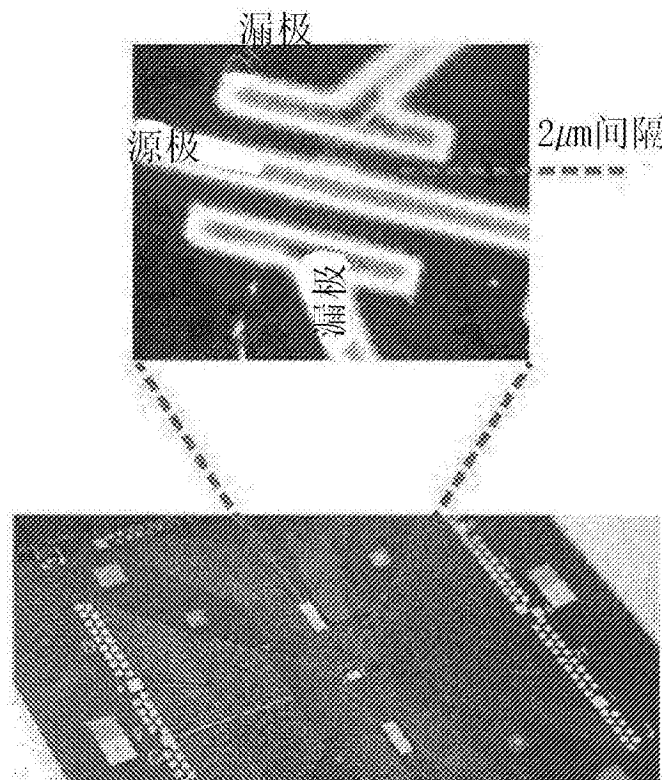
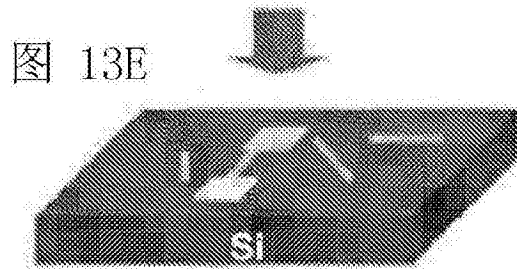
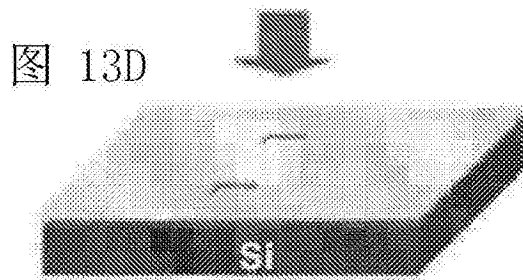
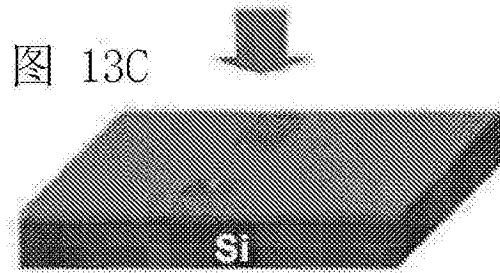
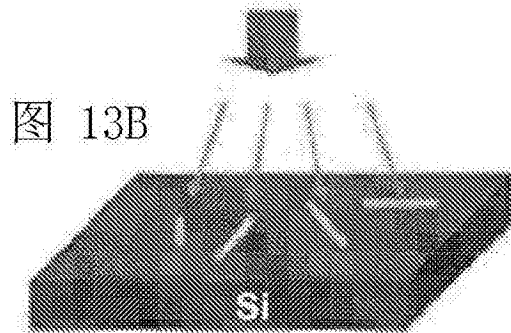
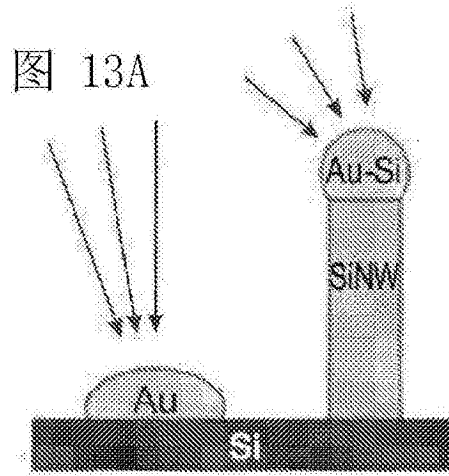


图12





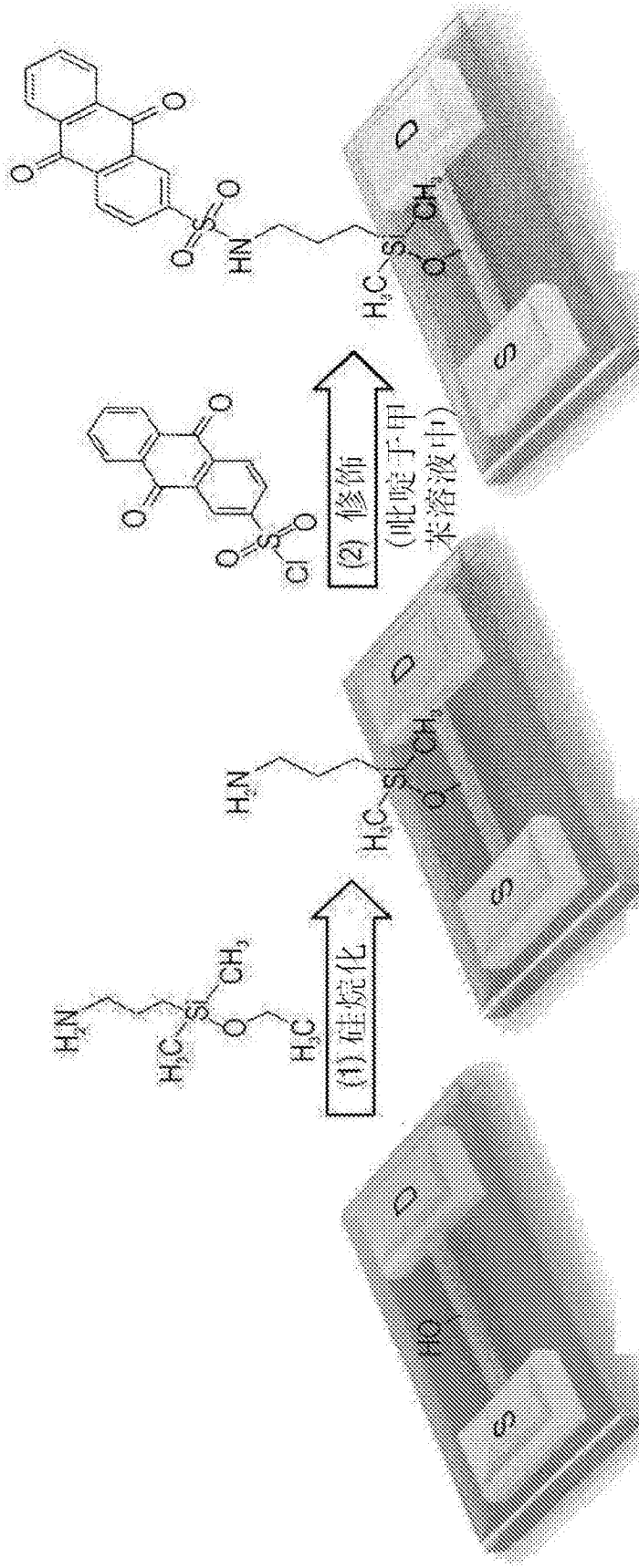


图 14C

图 14B

图 14A

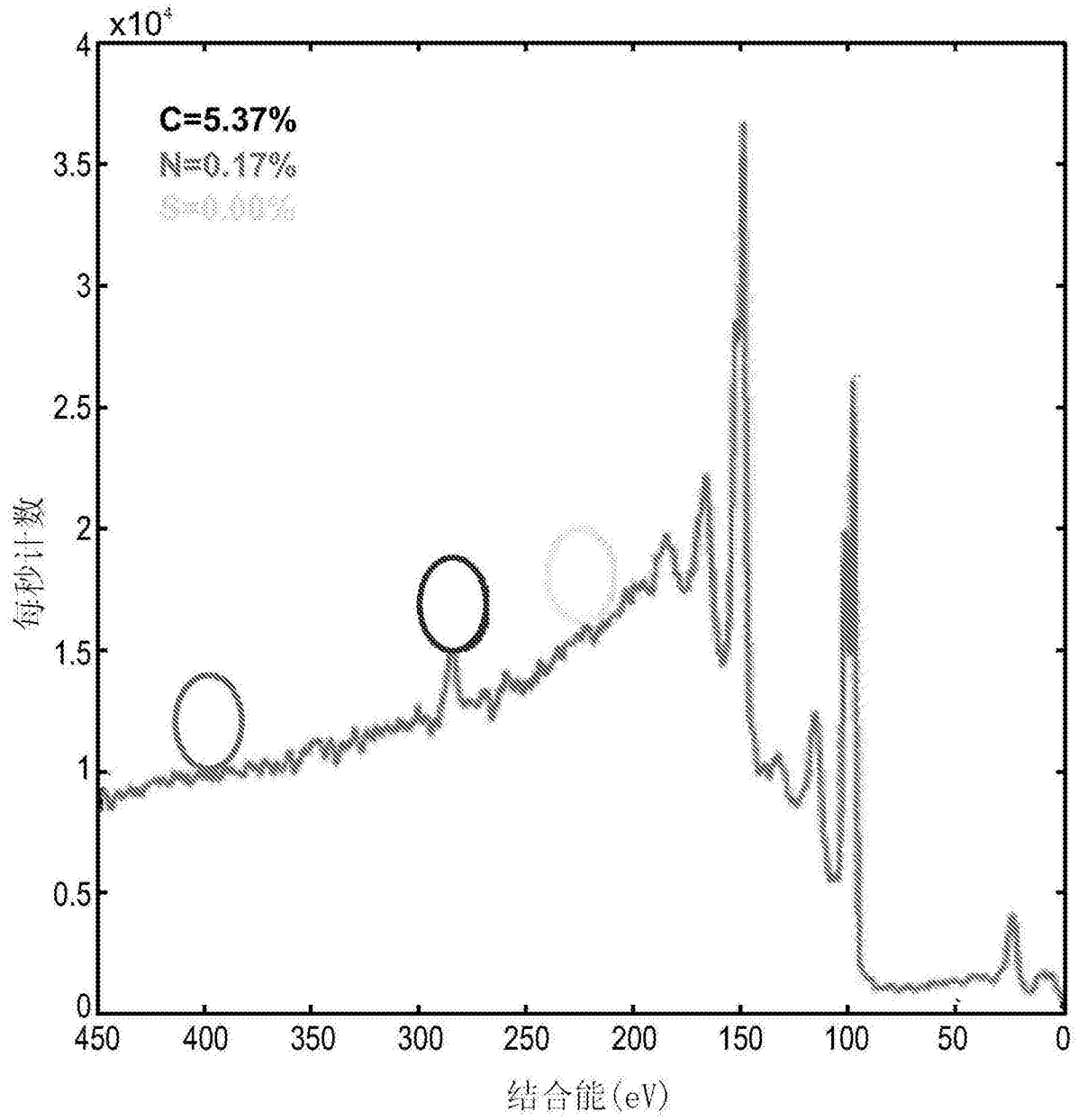


图14D

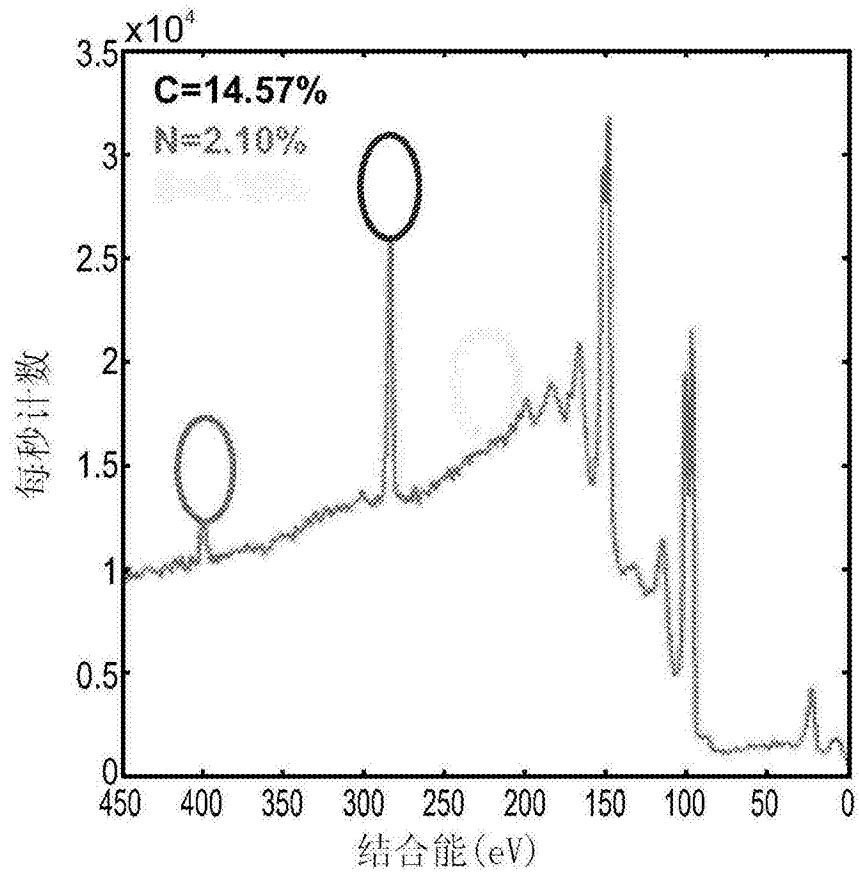


图14E

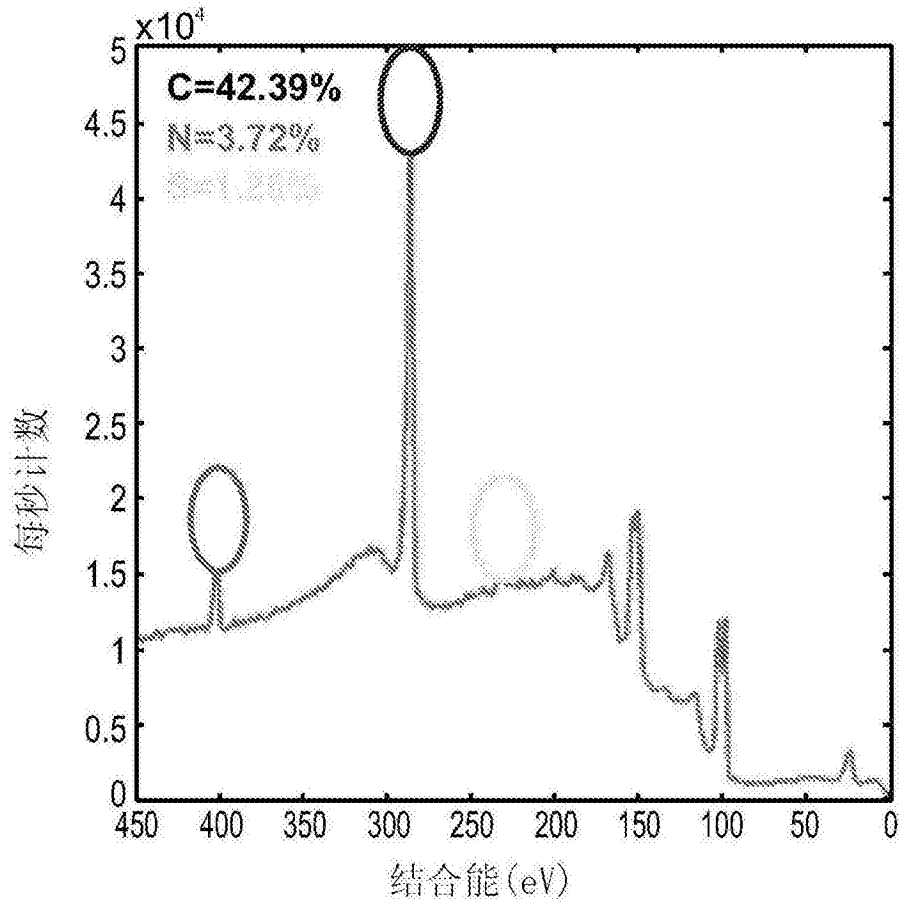


图14F

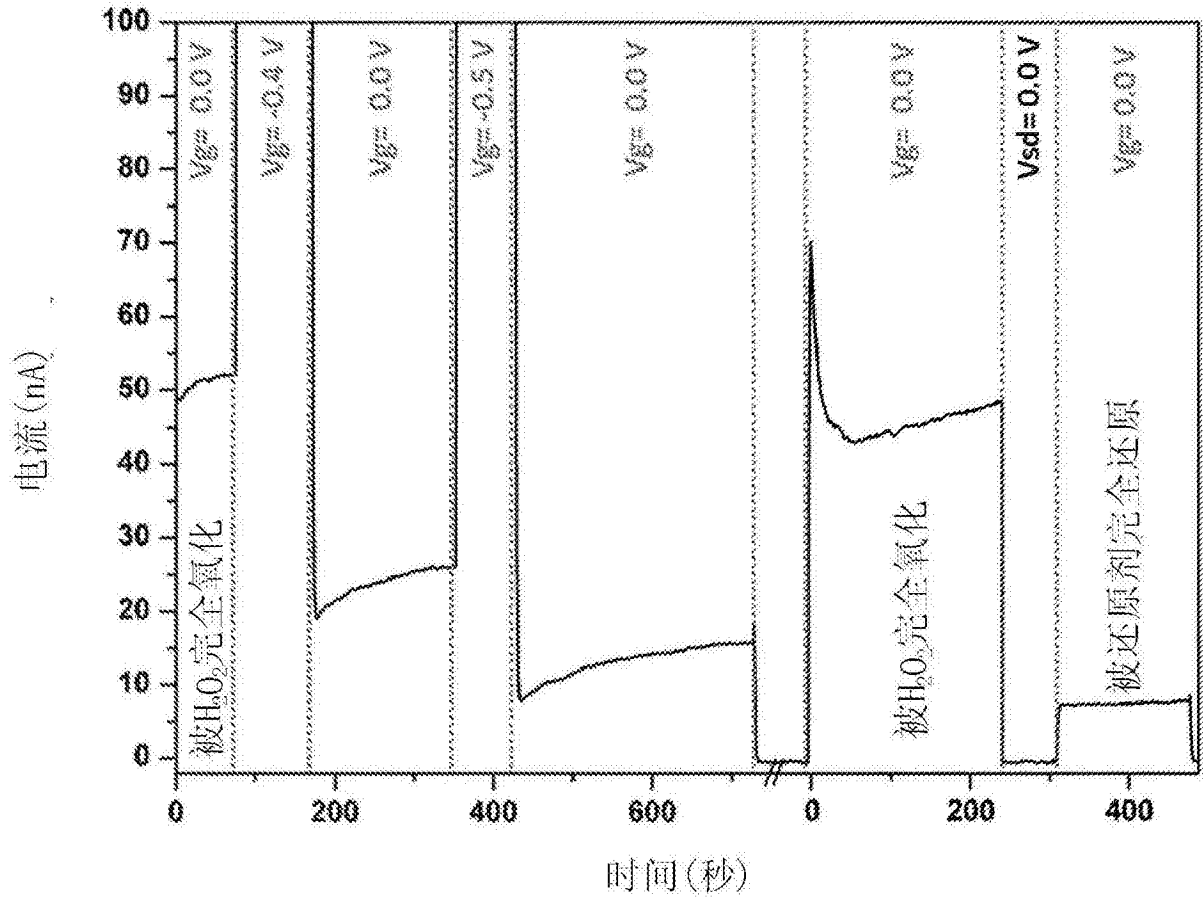


图15

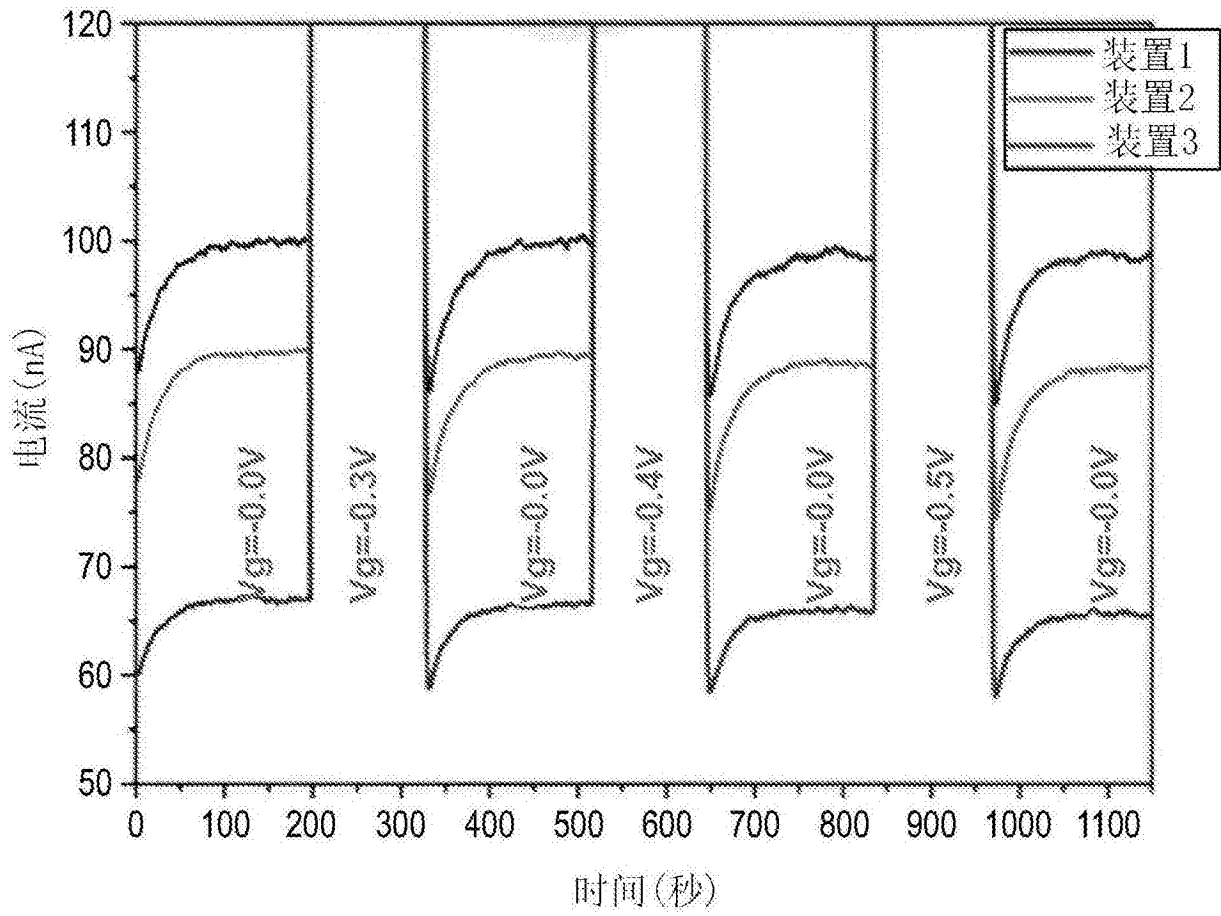
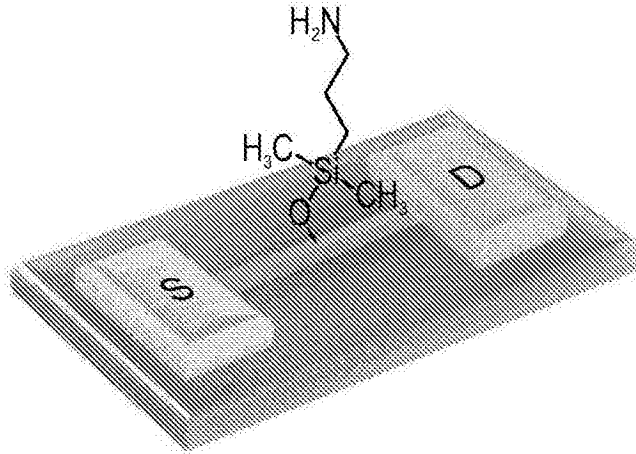


图16A

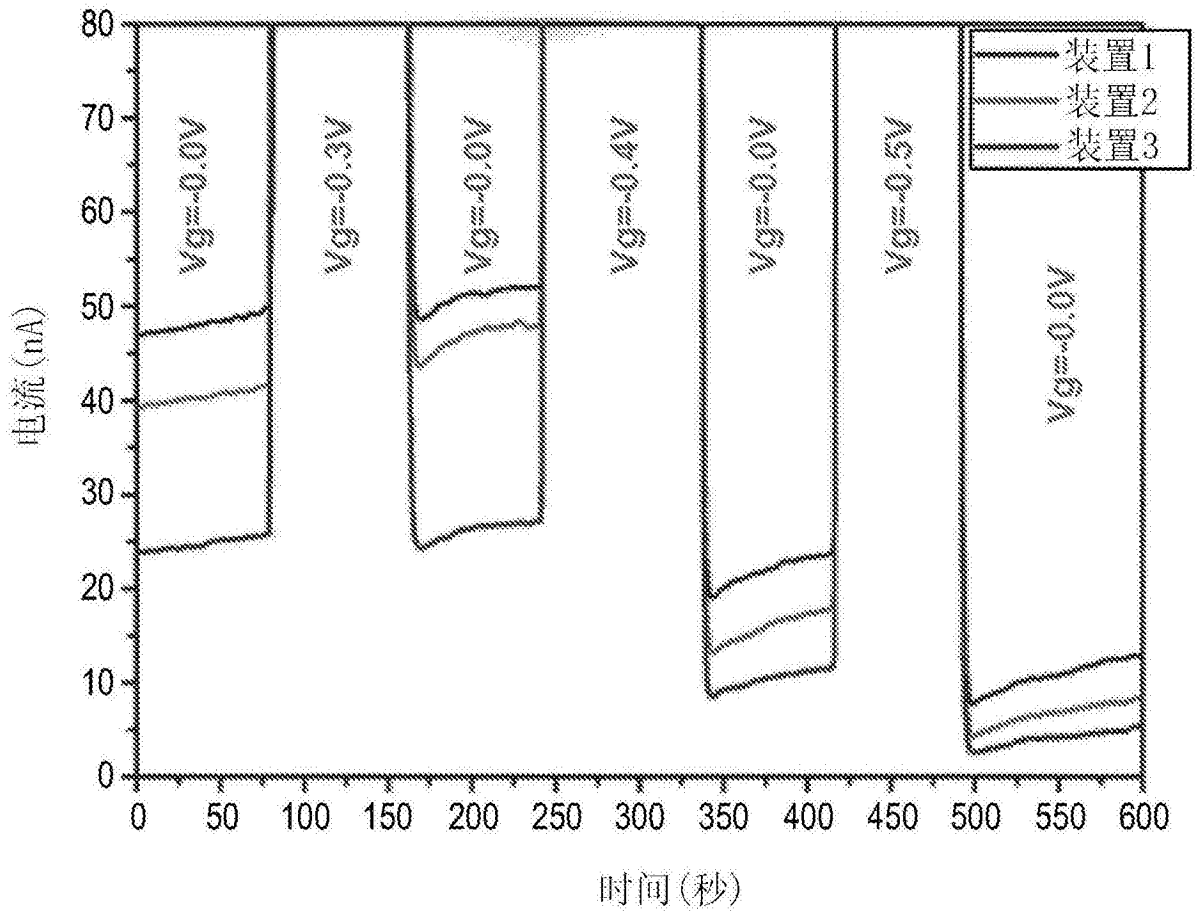
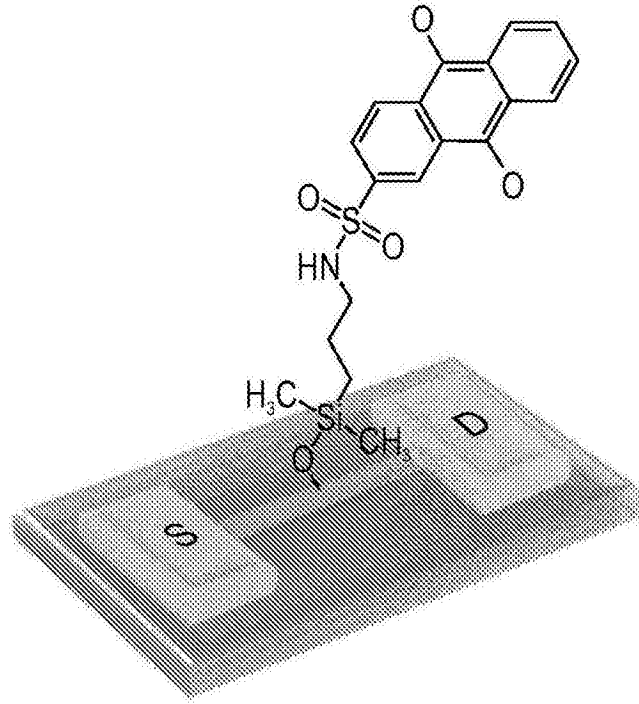


图16B



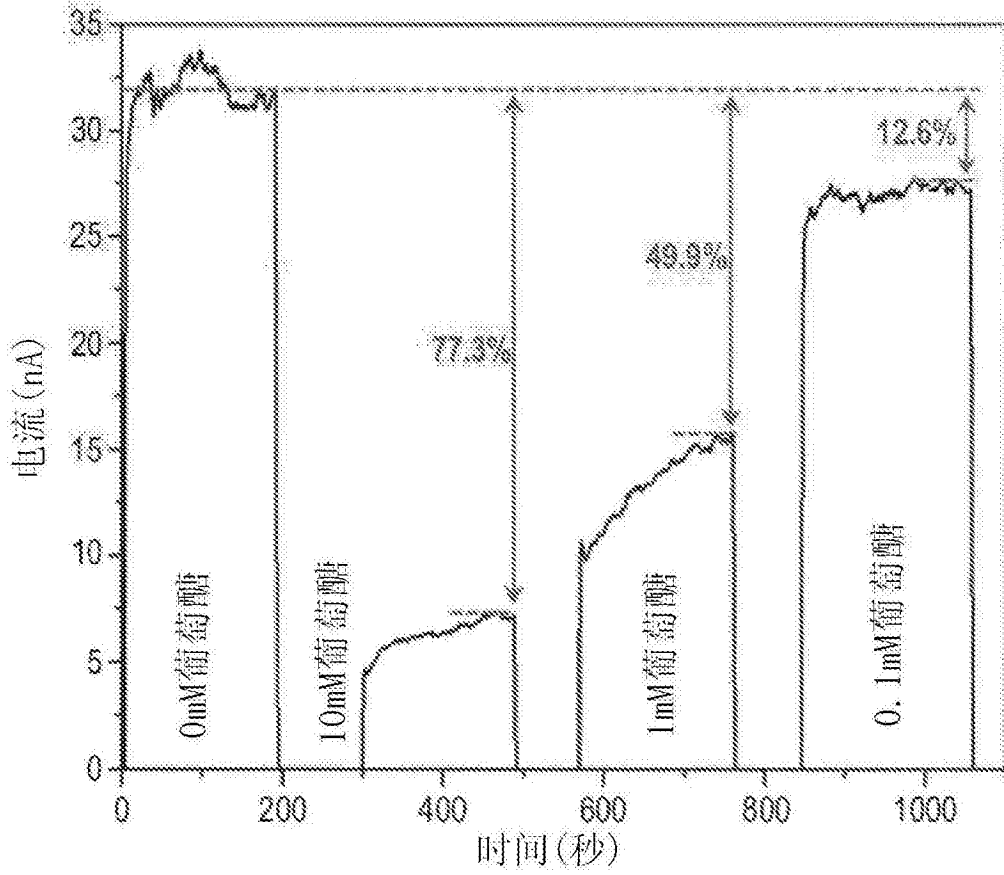


图17A

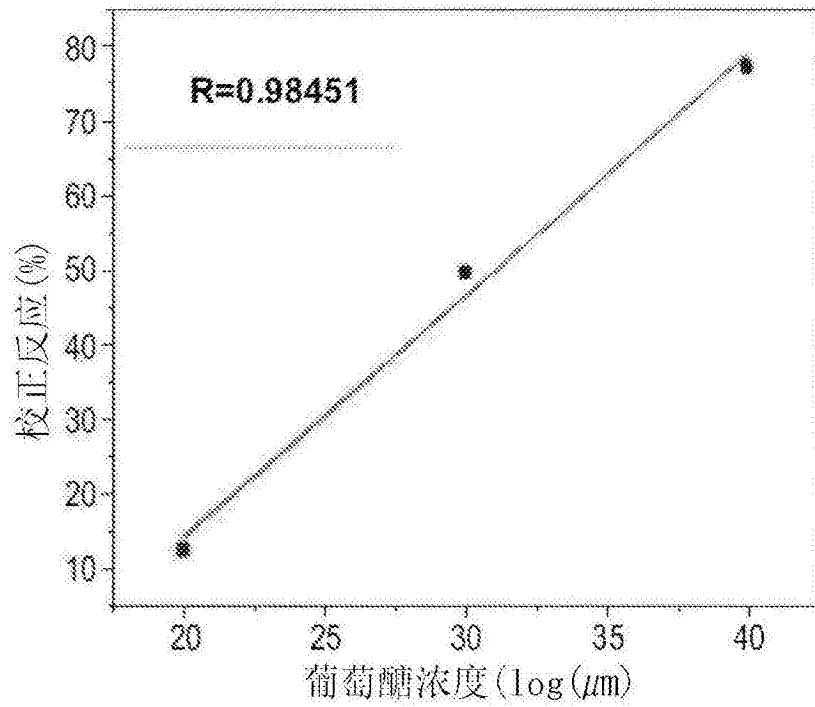


图17B

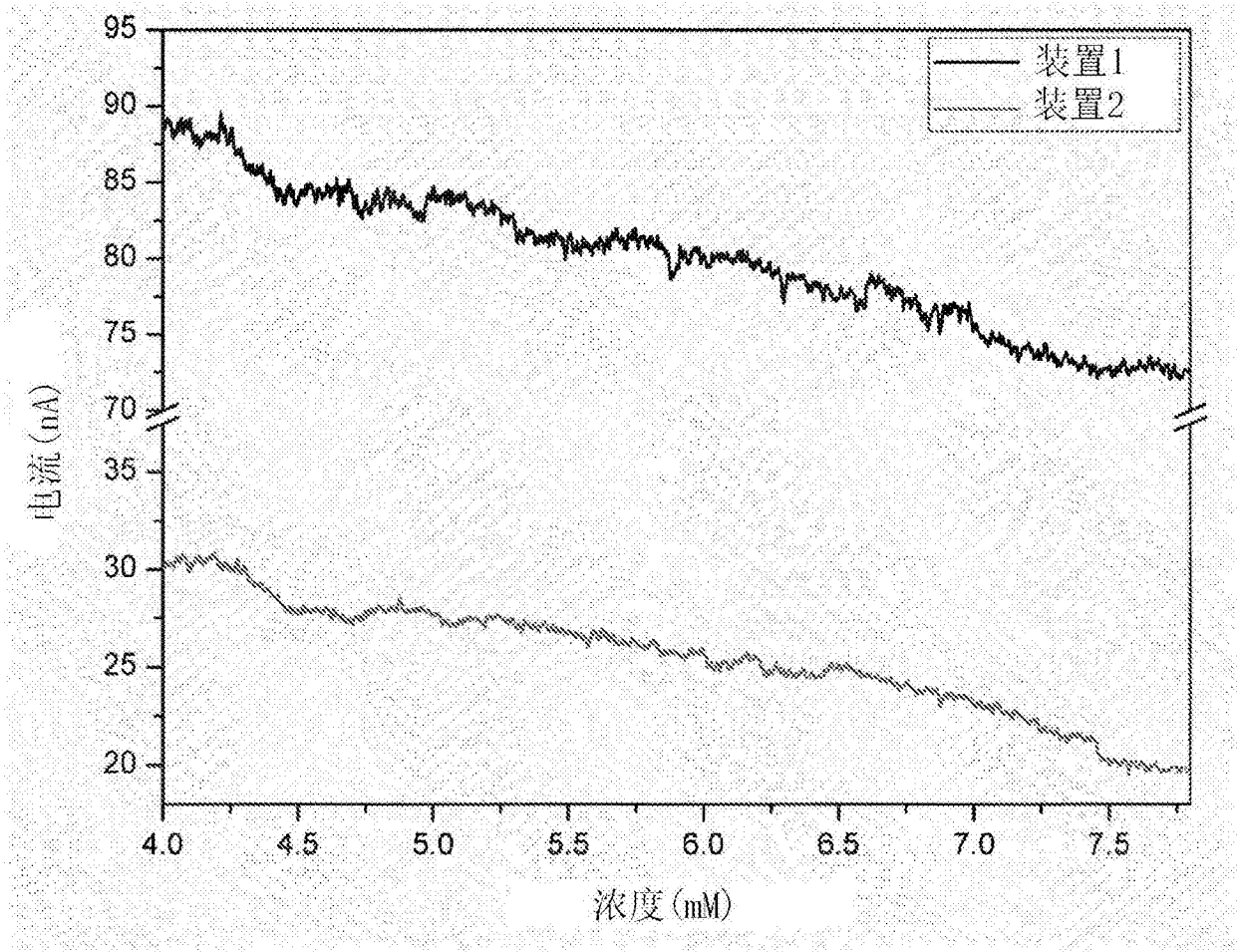


图18

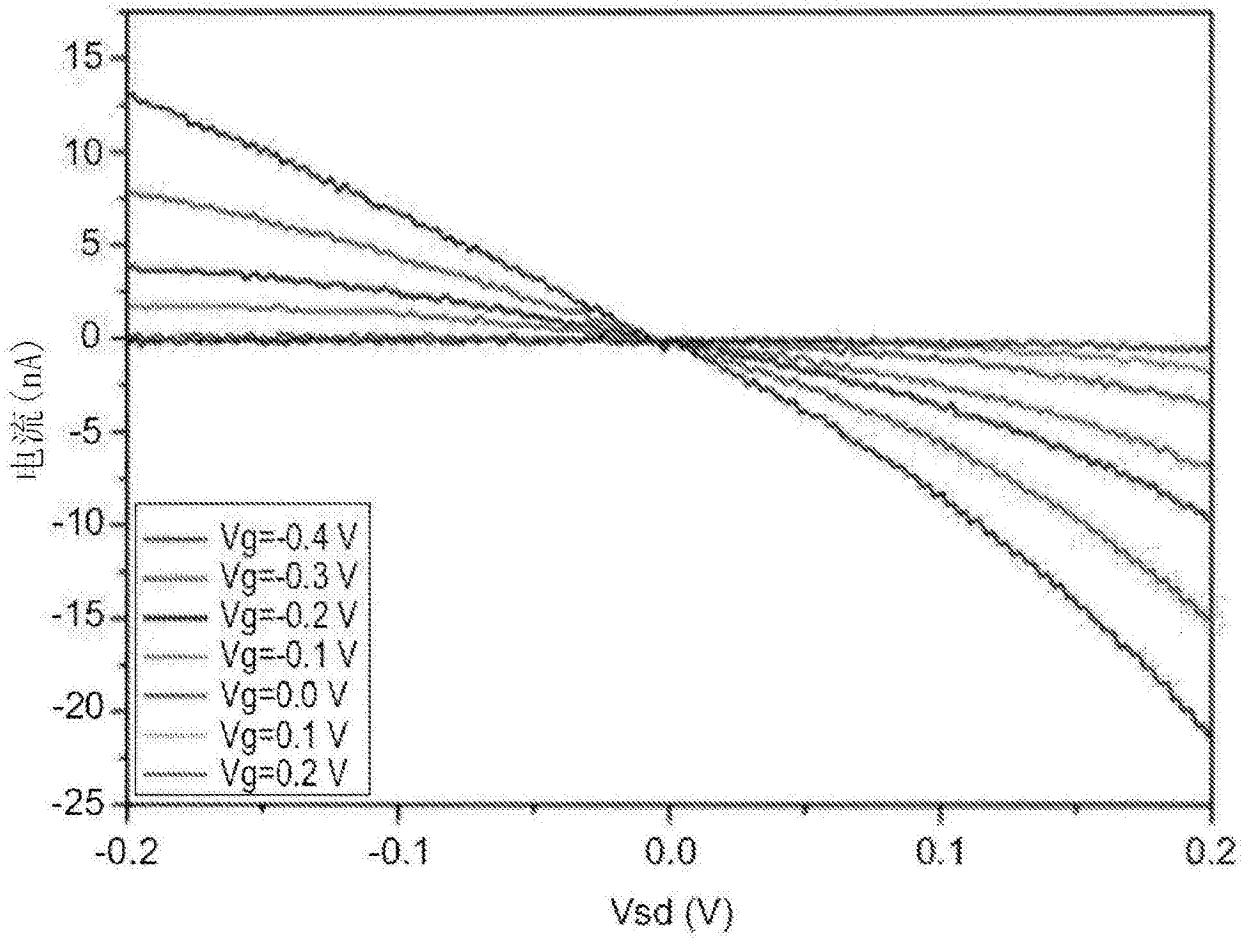


图19A

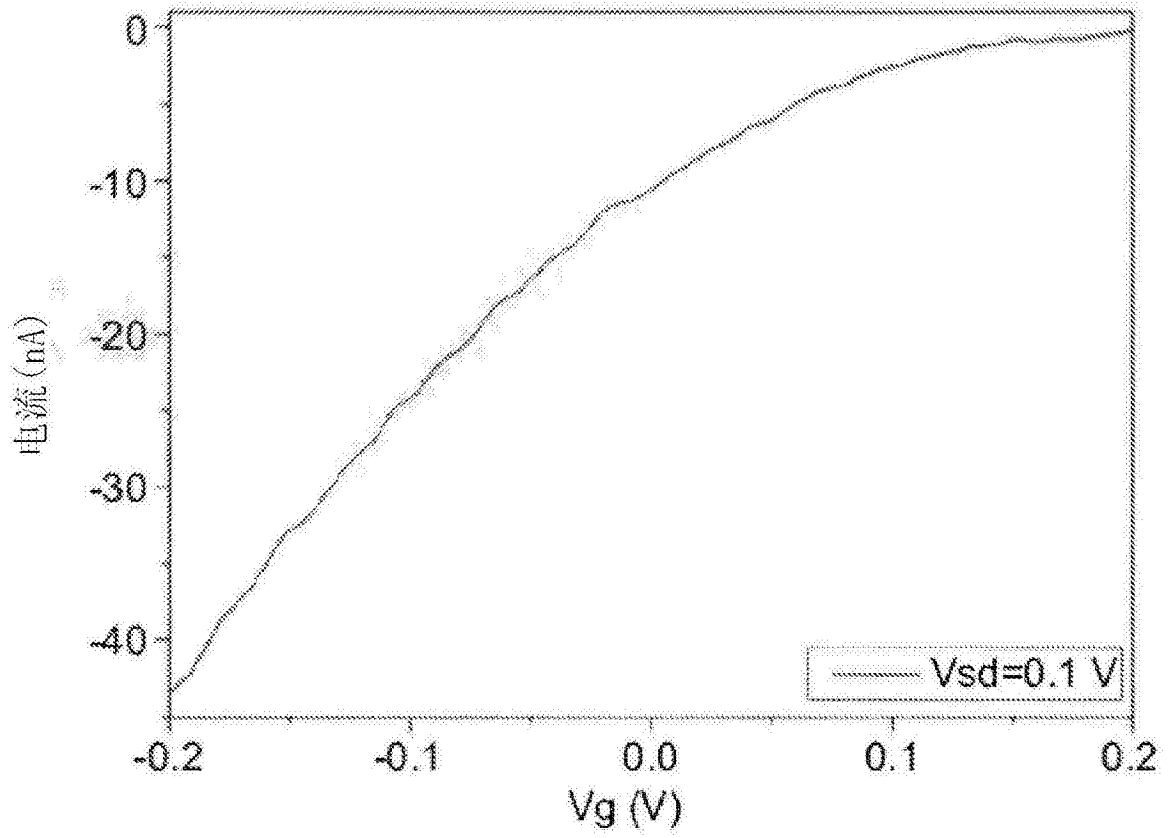


图19B

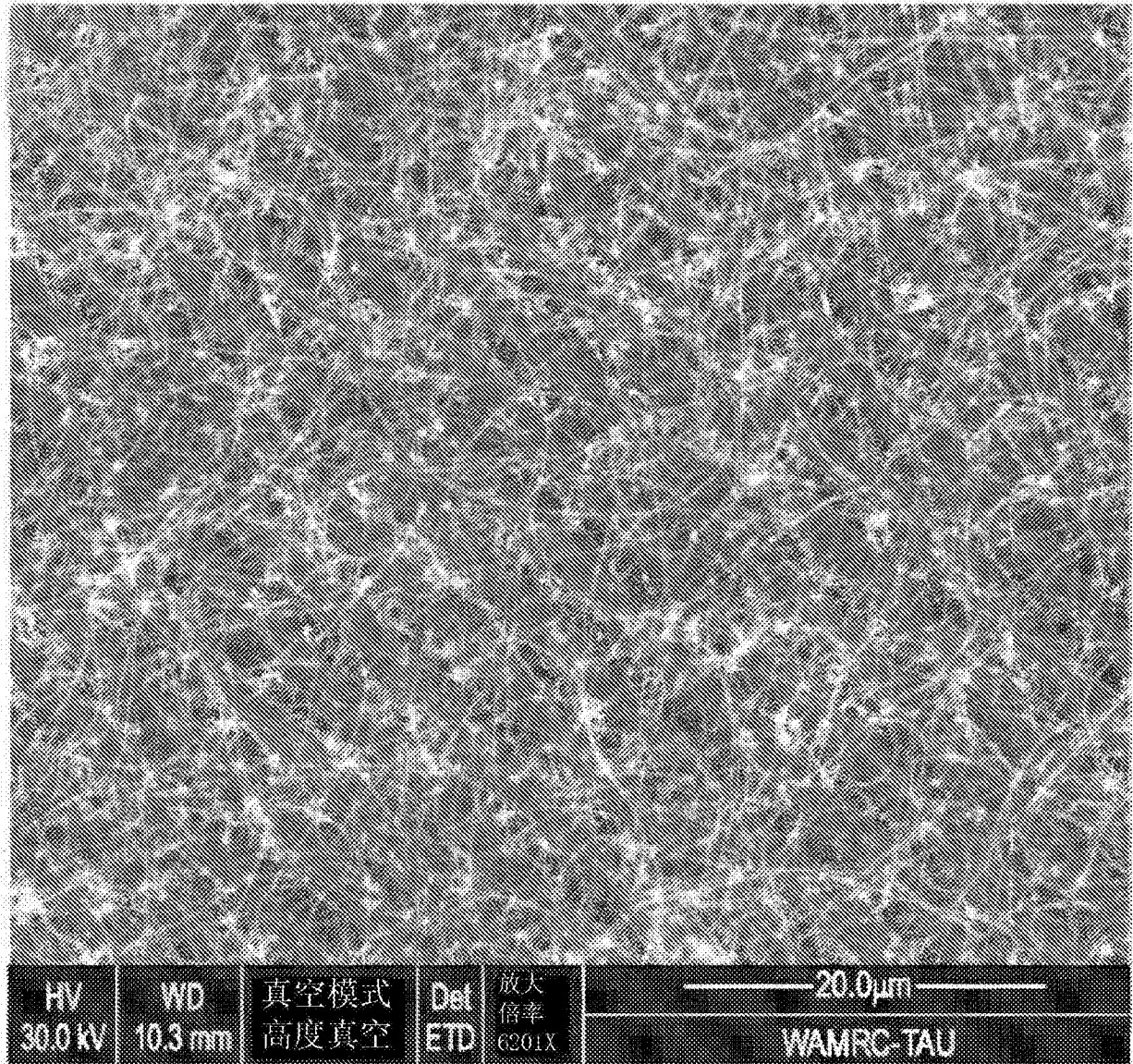


图20A

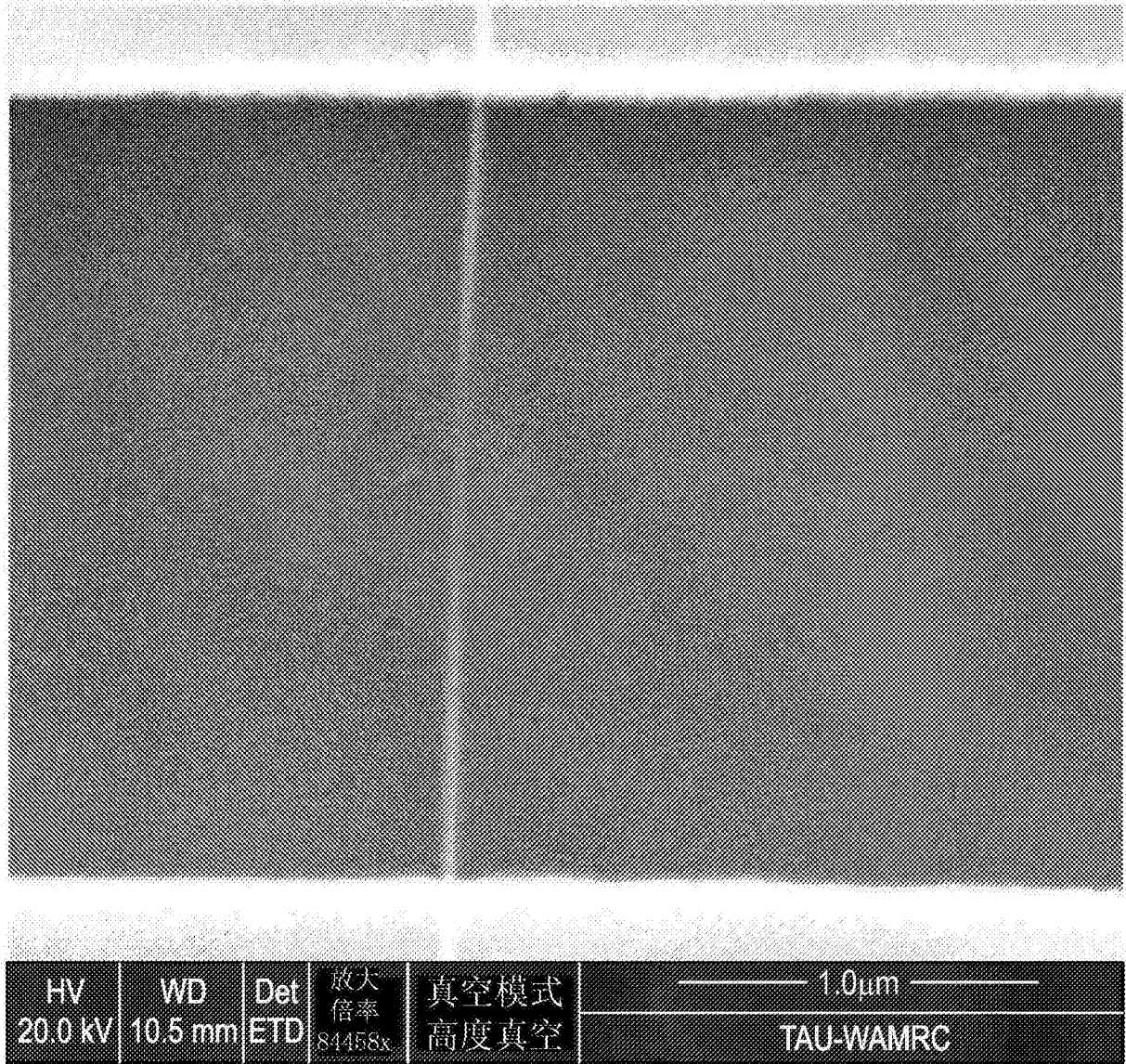


图20B