



(10)授权公告号 CN 105122070 B

(45)授权公告日 2018.06.26

(21)申请号 201480023849.9

(22)申请日 2014.02.26

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105122070 A

(43)申请公布日 2015.12.02

(30)优先权数据

61/770,586 2013.02.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.10.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/018488 2014.02.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/134095 EN 2014.09.04

(73)专利权人 北卡罗来纳—查佩尔山大学

地址 美国北卡罗来纳州

(72)发明人 J.M.拉姆齐 L.梅纳

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 叶晓勇 张懿

(51)Int.Cl.

G01N 35/08(2006.01)

G01N 27/02(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/483(2006.01)

(56)对比文件

Laurent D. Menard et.al.《A Device for Performing Lateral Conductance Measurements on Individual Double-Stranded DNA Molecules》.《ACS Nano》.2012,第6卷(第10期),device A,table 1,fig 2.

Ye Ai et.al.,《Field Effect Regulation of DNA Translocation through a Nanopore》.《Analytical Chemistry》.2010,第82卷(第19期),第8221页的“Effect of the Gate Potential”以及figure1,2.

审查员 唐艳艳

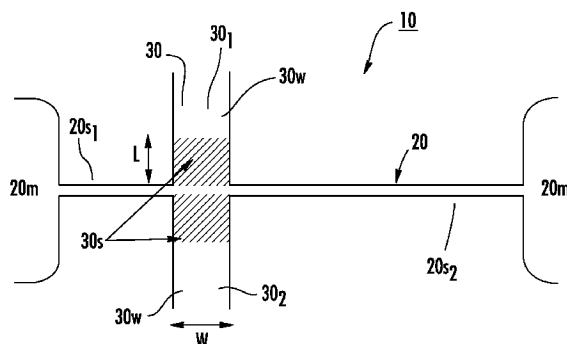
权利要求书3页 说明书15页 附图18页

(54)发明名称

带有用于高分子的受控捕捉、俘获和运输的集成组件的纳米流体器件及有关分析方法

(57)摘要

用于控制高分子的捕捉、俘获和传输的器件包括与带有(浅)区域的至少一个横向纳米通道和/或集成横向电极相交并且与其流体联系的至少一个流体运输纳米通道,集成横向电极允许分子输运动力的精细控制和促进诸如分子鉴定、长度确定、局部(探头)映射及诸如此类等关注的分析。



1. 一种纳米流体分析器件,包括:

至少一个流体输运纳米通道和至少一个横向的流体纳米通道,所述至少一个横向的流体纳米通道具有在所述至少一个流体输运纳米通道的相对侧上的浅段,其中所述浅段具有的纳米通道深度比所述流体输运纳米通道的纳米通道深度更小,并且其中所述至少一个流体输运纳米通道和所述至少一个横向的流体纳米通道的相交处位于所述至少一个流体输运纳米通道的入口端部和出口端部之间,以限定所述至少一个流体输运纳米通道的第一段和第二段;

与所述至少一个横向的流体纳米通道的所述浅段中的每一个浅段联系的电极;

与所述至少一个流体输运纳米通道的所述入口端部联系的电极;

与所述至少一个流体输运纳米通道的所述出口端部联系的电极;以及

配置成控制所述电极的操作以便以可控方式注入、俘获和输运高分子的电路,其中在操作中,所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段和第二段能够具有不同的场强,由此俘获高分子,以便所述高分子处于平衡或者低速移动,

其中所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段所具有的场强是所述至少一个流体输运纳米通道的所述第二段所具有的场强的50倍到1000倍或者所述至少一个流体输运纳米通道的所述第二段所具有的场强是所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段所具有的场强的50倍到1000倍。

2. 如权利要求1所述的器件,其中所述浅段合并到更深的段中,并且与所述流体输运纳米通道正交。

3. 如权利要求1所述的器件,其中所述浅段合并到更深的段中,并且与所述流体输运纳米通道平行。

4. 如权利要求1-3中的任一项所述的器件,还包括密封到基板的罩盖以限定流体分析芯片和在所述至少一个流体输运纳米通道中的DNA、RNA、肽、蛋白质的分子或其它生物高分子或合成高分子。

5. 一种器件,具有至少一个流体输运纳米通道以及与所述至少一个流体输运纳米通道的相对侧邻接的两个横向的集成电极,其中所述两个横向的集成电极与所述至少一个流体输运纳米通道的相交处在所述至少一个流体输运纳米通道的相对第一端部和第二端部之间存在某个距离以限定所述流体输运纳米通道的第一段和第二段,并且其中在操作中,所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段所具有的场强是所述至少一个流体输运纳米通道的所述第二段所具有的场强的50倍到1000倍或者所述至少一个流体输运纳米通道的所述第二段所具有的场强是所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段所具有的场强的50倍到1000倍。

6. 如权利要求5所述的器件,还包括至少部分存在于基板上和/或与所述基板联系的电路,所述电路配置成选择性地施加电压到所述流体输运纳米通道的所述第一端部和第二端部以及到所述横向的电极,以在所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段和第二段中生成不同的场强,并且以可控方式在所述流体输运纳米通道中和通过所述流体输运纳米通道注入、俘获和输运高分子。

7. 一种纳米流体分析系统,包括:

具有至少一个流体输运纳米通道的器件,所述至少一个流体输运纳米通道具有入口端

部和出口端部,每个与相应的电极联系,所述至少一个流体输运纳米通道具有或者与(i)带有第一段和第二段的至少一个横向的流体纳米通道的相交处,所述第一段和第二段跨所述流体输运纳米通道相互面对,每个与相应的电极联系,或者与(ii)两个横向的集成电极的相交处,所述两个横向的集成电极与所述至少一个流体输运纳米通道的相对侧邻接,

其中所述相交处位于所述至少一个流体输运纳米通道的出口端部和入口端部之间以限定所述至少一个流体输运纳米通道的第一段和第二段,并且其中在操作中,所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段所具有的场强是所述至少一个流体输运纳米通道的所述第二段所具有的场强的50倍到1000倍或者所述至少一个流体输运纳米通道的所述第二段所具有的场强是所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段所具有的场强的50倍到1000倍;以及

带有电源的电路,所述电路配置成施加电压到所述电极以通过所述至少一个流体输运纳米通道选择性地俘获和输运高分子。

8.如权利要求7所述的系统,其中所述器件包括带有所述第一段和第二段的所述至少一个横向的流体纳米通道,所述第一段和第二段跨所述流体输运纳米通道段相互面对,每个与相应的电极联系,并且其中所述至少一个横向的流体纳米通道的所述第一段和第二段是浅段,所述浅段具有的纳米通道深度比所述至少一个流体输运纳米通道的纳米通道深度更小。

9.如权利要求8所述的系统,其中所述至少一个横向的流体纳米通道的所述第一段和第二段是宽段,所述宽段具有的纳米通道宽度比所述流体输运纳米通道的纳米通道宽度更大。

10.如权利要求7-9中的任一项所述的系统,其中所述器件包括与相应的相交处协作的作为所述至少一个流体输运纳米通道的多个平行流体输运纳米通道。

11.如权利要求7-9中的任一项所述的系统,其中所述器件包括带有多组纵向间隔分开的相交处的至少一个流体输运纳米通道,每个相交处具有或者(i)带有第一段和第二段的横向的流体纳米通道的配置,或者(ii)所述两个横向的集成电极的配置。

12.一种分析高分子的方法,包括:

提供带有至少一个流体输运纳米通道的器件,所述至少一个流体输运纳米通道具有相交处,包括或者(i)带有第一段和第二段的至少一个横向的流体纳米通道,所述第一段和第二段相对于所述至少一个流体输运纳米通道是横向的并且自所述至少一个流体输运纳米通道的相对侧相互面对以及与所述至少一个流体输运纳米通道流体联系,所述至少一个横向的流体纳米通道的所述第一段和第二段中的每个与相应的电极联系,或者(ii)与所述至少一个流体输运纳米通道的相对侧邻接的第一横向的集成电极和第二横向的集成电极,其中所述相交处位于所述至少一个流体输运纳米通道的端部之间以限定相应的流体输运纳米通道的第一段和第二段;

跨所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段和第二段以及或者(i)所述至少一个横向的流体纳米通道的所述第一段和第二段或者(ii)所述第一横向的电极和第二横向的电极电施加偏置以在所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段和第二段中生成不同的场强以便在所述至少一个流体输运纳米通道中注入或俘获高分子,所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段所具有的场强是所述至少一个流体输运纳米通道的所述第二段

所具有的场强的50倍到1000倍或者所述至少一个流体输运纳米通道的所述第二段所具有的场强是所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段所具有的场强的50倍到1000倍；

电去除电施加的偏置，促使所述高分子驰豫，进入平衡构象；以及

仅沿所述至少一个流体输运纳米通道电施加偏置，控制通过所述至少一个流体输运纳米通道的所述高分子的输运。

13. 如权利要求12所述的方法，其中所述器件包括带有所述第一段和第二段的所述至少一个横向的流体纳米通道，并且其中所述至少一个横向的流体纳米通道的所述第一段和第二段是浅段，所述浅段具有的纳米通道深度比所述流体输运纳米通道的纳米通道深度更小。

14. 如权利要求13所述的方法，其中所述至少一个横向的流体纳米通道的所述第一段和第二段还是宽段，所述宽段具有的纳米通道宽度比所述流体输运纳米通道的纳米通道宽度更大。

15. 如权利要求13所述的方法，其中所述浅段合并到更深的段中，并且与所述至少一个流体输运纳米通道正交。

16. 如权利要求13所述的方法，其中所述浅段合并到与所述至少一个流体输运纳米通道平行的更深的段中。

17. 如权利要求12-15中的任一项所述的方法，其中所述器件是流体分析芯片，并且其中所述高分子是DNA、RNA、肽、蛋白质的分子或其它生物高分子或合成高分子。

18. 如权利要求12-15中的任一项所述的方法，其中所述电施加和去除步骤在定时算法和/或定时电路的引导下执行。

19. 如权利要求12-16中的任一项所述的方法，其中所述电施加和/或去除步骤由在所述至少一个流体输运纳米通道内限定位置的高分子的光学检测触发。

20. 如权利要求12-16中的任一项所述的方法，其中所述电施加和/或去除步骤由在所述至少一个流体输运纳米通道内限定位置使用离子电流、隧穿电流或场效晶体管测量的高分子的电气检测触发。

21. 如权利要求12-16中的任一项所述的方法，其中所述方法还包括：

(a) 通过检测在所述相交处前所述至少一个流体输运纳米通道的所述第一段中的电压更改来电子检测高分子，

(b) 启动施加和去除所述偏置的自动化循环以在所述至少一个流体输运纳米通道中和通过所述至少一个流体输运纳米通道选择性地注入、俘获和输运所述高分子以便进行分析。

带有用于高分子的受控捕捉、俘获和输运的集成组件的纳米流体器件及有关分析方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求具有2013年2月28日提出的美国临时申请61/770586的优先权,其内容通过引用结合于本文中,如同其全文在此陈述。

[0003] 联邦支持声明

[0004] 根据国立卫生研究院资助的授予编号HG002647,在政府支持下产生了本发明。政府对本发明具有某些权限。

技术领域

[0005] 本发明涉及使用应用流体学和纳米通道进行分子的检测/表征和/或测量。

背景技术

[0006] 近来,人们对在芯片实验室(lab-on-a-chip)流体器件中包含纳米级组件一直有相当大的关注。此关注的根源在于从微米级到纳米级的发展中几个优势(及可有利地利用的不同之处)。这些不同之处例如包括双层重叠(DLO)及其在电渗和选择渗透性上的效应、电场的局部增强、更高的表面体积比、在大的合成和生物聚合物上的限制效应及熵效应的新兴重要性。请参阅例如由Yuan等人在*Electrophoresis* 2007,28,595-610;Schoch等人在*Rev.Mod.Phys.* 2008,80,839-883;及Kovarik等人在*Anal.Chem.* 2009,81,7133-7140所著内容。纳米级器件的历史性示例包括通过纳米孔在色谱分离和滤膜中使用多孔介质和凝胶。请参阅例如由Lerman等人在*Biopolymers* 1982,21,995-997;和Tong等人在 *M.Nano Lett.* 2004,4,283-287所著内容。然而,近来的尝试一直集中于在为流体和分析物设计在几何形状上明确的导管和将它们无缝集成到器件中。请参阅例如由Volkmut等人在*Nature* 1992,358,600-602;和Striemer等人在*Nature* 2007,445,749-753所著内容。此类常规结构的优点是压力和场梯度、流体流动和其内包含的分子运动的相对简单性,而不同于在更曲折的网络中的这些属性。定义、表征和轻松为这些系统建模的能力例如能够允许更好地理解分离机制和单分子物理学。请参阅例如由Volkmut等人在*Nature* 1992,358,600-602;Reisner等人在*Phys.Rev.Lett.* 2005,94,196101;及Salieb-Beugelaar等人在*Lab Chip* 2009,9,2508-2523中所著内容。

[0007] 近来,FIB研磨技术已被描述成形成纳米流体器件。请参阅由Menard等人所著“使用聚焦离子束研磨在绝缘基板中制作小于5 nm纳米通道”(Fabrication of Sub-5 nm Nanochannels in Insulating Substrates Using Focused Ion Beam Milling, *Nano Lett.* 2011, 11, 512-517) (2010年12月20日发布)和2010年9月21日提出,题为“用于形成纳米通道的方法、系统和器件”(Methods, Systems And Devices For Forming Nanochannels)的美国临时专利申请61/384738(及有关PCT申请PCT/US2011/052127),其内容通过引用结合于本文中,如同其全文在此陈述。除FIB研磨外,能够使用适合用于纳米通道制作的多种其它方法,例如包括电子束光刻、纳米压印光刻、光刻、制模或塑造策略及本

领域技术人员理解的其它方法。

[0008] 人们已提议了多种纳米流体器件,包括用于单分子感应和/或核酸测序的带有集成微型电极(纳米或微米级)的那些纳米流体器件。将电极包含为器件组件能够要求困难的制作,并且电极几何形状的小差别可导致高的器件到器件变化性。另外,基于荧光的系统能够具有有限的时间分辨率,一般在每秒大约400帧或更少,并且可要求较大和/或昂贵的光学和成像组件。还存在对备选器件设计和/或评估技术的需要。

发明内容

[0009] 本发明的实施例配置成提供通过使用带有显著不同电场强度段的相应纳米通道的电动控制和/或使用浓度极化,促进通过具有比在分析的分子(高分子)的回转半径更小的临界尺寸的纳米通道的捕捉、俘获和运输的器件,由此允许极大高分子的捕捉,并且分裂的发生率降低。

[0010] 本发明的实施例提供极快地推动DNA到运输通道的纳米通道入口,并且在分子上应用足够的力以克服熵障碍以便穿入到纳米通道。DNA能够快速通过纳米通道的第一部分输送,但随后在与横向电极或纳米流体元件的相交处速度降低。

[0011] 本发明的实施例提供诸如用于DNA分析的芯片等具有至少一个流体运输纳米通道的器件,带有浅区域的至少一个纳米通道与运输纳米通道和/或与集成电极相邻并与其流体联系,以确定关注的特性或参数,如分子鉴定、长度确定、局部(探头)映射及诸如此类。

[0012] 本发明的实施例涉及纳米流体分析器件。器件包括至少一个流体运输纳米通道和至少一个流体纳米通道,在至少一个流体运输纳米通道的端部之间存在某个距离的相交处的流体运输纳米通道段的相对侧上有两个浅段,以限定相应流体运输纳米通道的第一段和第二段。器件也包括与相应浅段联系的第一和第二电极和配置成控制电极的操作以便以可控方式注入、俘获和运输高分子的电路,第一电极与流体运输纳米通道的入口端部联系,第二电极与流体运输纳米通道的出口端部联系。在操作中,第一和第二段能够具有显著不同的场强度,以由此俘获高分子,以便高分子处于平衡或者低速移动。

[0013] 浅段能够并入更深段中,并且能够与流体运输纳米通道正交。

[0014] 浅段能够并入更深段中,并且能够与流体运输纳米通道平行。

[0015] 器件能够包括密封到基板的罩盖以限定流体分析芯片和在至少一个流体运输纳米通道中的DNA、RNA、肽、蛋白质的分子或其它生物或合成高分子。

[0016] 其它实施例涉及具有至少一个流体运输纳米通道和在与运输通道的相交处与至少一个流体运输纳米通道的相对侧邻接的两个横向集成电极的器件,相交处在至少一个流体运输纳米通道的相对第一和第二端部之间存在某个距离以限定运输纳米通道的第一段和第二段。在操作中,第一和第二段具有显著不同的场强。

[0017] 器件能够包括至少部分存在于基板上和/或与基板联系的电路,基板配置成选择性地施加电压到流体运输纳米通道的第一和第二端部以及到横向电极,以生成显著不同的场强,并且以可控方式在流体运输纳米通道中和通过流体运输纳米通道注入、俘获和运输高分子。

[0018] 还有的其它实施例涉及纳米流体分析系统。系统包括具有至少一个流体运输纳米通道的器件,流体运输纳米通道具有与(i)带有第一和第二段的至少一个流体纳米通道的

相交处,第一和第二段跨流体输运纳米通道相互面对,每个与相应电极联系,或者与(ii)两个横向集成电极的相交处,两个横向集成电极与至少一个流体输运纳米通道的相对侧邻接。相交处在至少一个流体输运纳米通道的相对端部之间存在某个距离以限定相应流体输运纳米通道的第一段和第二段。器件也包括带有电源的电路,电源配置成施加电压到电极以通过至少一个流体输运纳米通道选择性地俘获和输运高分子。

[0019] 器件能够包括带有第一和第二段的至少一个流体纳米通道,第一和第二段跨流体输运纳米通道相互面对,每个与相应电极联系,并且第一和第二段是浅段。

[0020] 第一和第二段能够是宽段。

[0021] 器件能够包括与相应相交处协作的多个平行流体输运纳米通道。

[0022] 器件能够包括带有多个纵向间隔分开的相交处的至少一个流体输运纳米通道,每个相交处具有(i)带有第一和第二段的流体纳米通道,第一和第二段跨流体输运纳米通道相互面对,每个与相应电极联系,或者(ii)与至少一个流体输运纳米通道的相对侧邻接的两个横向集成电极。

[0023] 还有的其它实施例涉及分析高分子的方法。方法包括:(a)为提供具有相交处的至少一个流体输运纳米通道,相交处包括(i)带有第一和第二段的至少一个流体纳米通道,第一和第二段跨与输运通道流体联系的流体输运纳米通道段相互面对,每个与相应电极联系,或者(ii)与至少一个流体输运纳米通道的相对侧邻接的第一和第二横向集成电极;(b)跨第一和第二段或第一和第二横向电极电施加偏置,以在流体输运通道中注入或俘获高分子;(c)电去除所有偏置,促使高分子驰豫,进入某个平衡构象;以及(d)仅跨输运纳米通道电施加偏置,控制通过纳米通道的高分子的迁移。

[0024] 器件能够包括带有第一和第二段的至少一个流体纳米通道,并且第一和第二段能够是宽、浅段。

[0025] 浅段能够并入更深段中,并且能够与流体输运纳米通道正交。

[0026] 浅段能够并入与流体输运纳米通道平行的更深段中。

[0027] 器件能够是流体分析芯片,并且高分子能够是DNA、RNA、肽、蛋白质的分子或其它生物或合成高分子。

[0028] 电施加和去除步骤能够在定时算法和/或定时电路的引导下执行。

[0029] 电压步骤能够由在输运纳米通道内限定位置的分析物分子的光学检测触发。

[0030] 电压步骤能够由在输运纳米通道内限定位置使用离子电流、隧穿电流或场效晶体管测量的分析物分子的电气检测触发。

[0031] 方法能够包括电子检测在相交处前与在流体输运纳米通道的第一部分的分析物的通过相关联的电压更改,以启动施加和去除偏置的自动化循环,在流体输运纳米通道中和通过流体输运纳米通道选择性地注入、俘获和输运相应高分子以便进行分析。

[0032] 要注意的是,相对于一个实施例描述的本发明的方面虽然在不同实施例中未相对于其进行明确描述,但可包含在其中。也就是说,所有实施例和/或任何实施例的特征能够以任何方式和/或在任何组合中组合。申请人保留更改任何最初提出的权利要求和/或相应地提出任何新权利要求的权利,包括虽然在最初未以该方式要求权利保护,但能够修改任何最初提出的权利要求以取决于和/或包含任何其它权利要求的任何特征的权利。在下面陈述的说明书中,将详细解释本发明的这些和其它目的和/或方面。通过阅读后面的优选实

施例的图形和详细描述,本领域技术人员将领会本发明的其它特征、优点和细节,此类描述只是说明本发明。

附图说明

[0033] 图1是根据本发明的实施例,带有位置与输运纳米通道邻近的宽、浅纳米流体通道的器件的示意图。

[0034] 图2A是根据本发明的实施例的类似于图1的器件的示意图,示出输运纳米通道的示范电场强度、段中的离子电阻(R)和段的长度(L)。

[0035] 图2B是根据本发明的实施例,包括位置在输运纳米通道旁的集成横向电极的纳米流体分析器件的一备选实施例。

[0036] 图3A和3B是纳米通道配置用于通过使用浓度极化,实现到输运纳米通道的聚合电解质引入和随后俘获的纳米流体器件的示意图[阳离子(对于黑白色版本,阴离子示有X标记以区分它们和阳离子)]。图3A示出在未施加电压时带有示范离子分布的器件,并且图3B示出在输运通道(V1)的出口处和在两侧通道(V2)施加正电压时的离子分布。

[0037] 图4A-4C是根据本发明的实施例,带有操作的三个阶段(注入(4A)、平衡(4B)和输运(4C))的示范器件的示意图。

[0038] 图4D和4E是根据本发明的实施例,在使用和未使用横向通道的情况下,通过引入到DNA上的关联力计算,被拉入纳米通道的DNA的示意图。

[0039] 图5A是根据本发明的实施例,带有不同浅通道几何形状的高分子输运的示意图,浅通道几何形状能够通过跨器件的纳米通道网络施加单个电压进行控制。

[0040] 图5B是根据本发明的实施例,指示通过纳米通道的离子电阻的等效电路的电路图。

[0041] 图5C是相对于图5A和5B显示的器件的倒置SEM图像。

[0042] 图5D是根据本发明的实施例的器件的示意图,其中,通过独立施加电压到每个纳米通道,控制高分子输运。

[0043] 图5E是与图5D的配置相关联的四储器器件的SEM图像。

[0044] 图5F和5G是另一示范器件的倒置SEM图像,其中,输运纳米通道和浅横向通道完全使用FIB研磨制作。

[0045] 图5H是图5G中显示的器件的原子力显微镜分布图。

[0046] 图6A是根据本发明的实施例的注入/捕捉器件的明场光学显微镜图像。

[0047] 图6B是根据本发明的实施例,示出在跨纳米通道网络施加4V时在0.5X TBE缓冲液中荧光素染料的浓度增强和耗竭的荧光显微镜图像。

[0048] 图7是根据本发明的实施例,示出通过类似于图5A中显示的器件的 λ -DNA的捕捉和随后输运的一系列帧的图像。帧率是每帧200 ms。箭头指示施加了所注电压。

[0049] 图8是根据本发明的实施例,示出通过类似于图5A中显示的器件的 λ -DNA的输运的一系列帧的图像。帧率是每帧4 ms。跨流体网络施加了4V的偏置。实验使用更高离子强度缓冲液(10X TBE)执行以减少DNA捕捉。箭头指示随时间变化的速度。

[0050] 图9A是根据本发明的实施例,示出对 λ -DNA通过类似于图5D中显示的器件的输运的控制的一系列帧的图像。帧率是每帧200 ms。DNA保持固定或者通过20 nm x 20 nm(宽度

x深度) 输运纳米通道低速输运。箭头指示施加所注电压的时间/位置。

[0051] 图9B是使用用于 $V_{\text{transverse}}$ 和 $V_{\text{transport}}$ 的各种电压的事件与输运速度(cm/s)的实验数据的曲线图,示出本发明的实施例允许的可调吞量和速度。

[0052] 图10A-10C是根据本发明的实施例,用于为使用相应流体分析器件控制捕捉、俘获和输运而施加电压和/或深度梯度的备选纳米流体通道配置的顶部示意图。

[0053] 图11A-10C是根据本发明的实施例,用于在相应流体器件中施加控制捕捉、俘获和输运的电压的横向电极的备选示范配置的顶部示意图。

[0054] 图12是根据本发明的实施例,用于操作流体分析器件的示范电路的电路图。

[0055] 图13是根据本发明的实施例,用于操作流体分析器件的另一示范电路的电路图。

具体实施方式

[0056] 现在,将参照显示本发明的实施例的附图,在下文更全面地描述本发明。然而,本发明可体现为许多不同形式,并且不应视为限于本文中陈述的实施例。类似的标号指所有图形中类似的要素。在图中,为清晰起见,可夸大某些层、组件或特征,并且除非另有说明,否则,虚线示出可选特征或操作。另外,除非另有具体说明,否则,操作(或步骤)顺序不限于图形和/或权利要求中所示顺序。在图中,为清晰起见,可夸大线条的厚度、层、特征、组件或区域,并且除非另有说明,否则,虚线示出可选特征或操作。

[0057] 在本文使用的术语只用于描述特殊的实施例,并无意限制本发明。在本文使用时,除非上下文有明确指示,否则,单数形式还将包括复数形式。还可理解,术语“包括”在本说明书中使用时用于表示所述特性、区域、步骤、操作、元件和/或组件的存在,而不排除存在或添加一个或多个其它特性、区域、步骤、操作、元件、组件和/或其组合。在本文使用时,术语“和/或”包括一个或多个相关联所列项目的任一和所有组合。在本文中使用,诸如“在X与Y之间”和“在大约X与Y之间”等词语应理解为包括X和Y。在本文中使用,诸如“在大约X与Y之间”等词语表示“在大约X与大约Y之间”。在本文中使用,诸如“从大约X到Y”等词语表示“从大约X到大约Y”。

[0058] 将理解的是,在诸如层、区域或基板等特征被描述为在另一特征或元件“上”时,它能够直接在该另一特征或元件之上,或者中间特征和/或元件也可存在。与此相反,一个元件被描述为“直接”在另一特征或元件上时,不存在中间元件。还将理解的是,在一个元件被描述为“连接”、“附连”或“耦合”到另一特征或元件时,它可直接连接、附连或耦合到该另一元件,或者中间元件可存在。与此相反,一个元件被描述为“直接连接”、“直接附连”或“直接耦合”到另一元件时,不存在中间元件。虽然相对于一个实施例描述或示出,但如此描述或示出的特征能够应用到其它实施例。

[0059] 除非另有规定,否则,本文使用的所有术语(包括技术和科学术语)具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的相同含意。还将理解的是,除非在本文中有明确定义,否则,诸如常用词典中定义的那些术语等术语应理解为具有与本申请和相关技术上下文中含意一致的含意,并且不应以理想化或过分正式的方式理解。为简明和/或清晰起见,可不描述熟知的功能或构造。

[0060] 诸如“在下方”、“下面”、“底部”、“在上方”、“上部”及诸如此类等空间相对术语可在本文使用以便于说明,描述如图所示的一个元件或特征与另一元件或特征的关系。将理

解的是,空间相对术语旨在包括除图中所示定向外在使用或操作的器件不同的定向。例如,如果图中的器件倒置,描述为在其它元件或特性“下方”或“底下”的元件因而将定向为在其它元件或特性的“上方”。因此,示范术语“在下方”可包含“在上方”和“在下方”的定向。器件可以其它方式定向(旋转90度或在其它定向),并且本文使用的空间相对描述符可相应地解释。类似地,除非另有具体说明,否则,术语“向上”、“向下”、“垂直”、“水平”及诸如此类在本文只用于解释。

[0061] 将可理解,虽然术语第一、第二等可在本文用于描述不同的部件、组件、区、层和/或部分,但这些部件、组件、区、层和/或部分将不受这些术语的限制。这些术语只用于区分一个元件、组件、区、层或部分与另一区、层或部分。因此,在不脱离本发明讲授内容的情况下,下述的第一部件、组件、区、层或部分可表示第二部件、组件、区、层或部分。

[0062] 术语“纳米通道”指具有在纳米级的临界尺寸的通道或沟槽。纳米通道具有侧壁和底部。纳米通道能够形成到固态基板中,以具有开放顶部表面和封闭底部表面,而侧壁延长在其之间。罩盖可用于密封或以其它方式封闭纳米通道的上方表面。术语“主要尺寸”指宽度和/或深度尺寸。流体输运纳米通道的主要尺寸能够在大约1 nm到大约500 nm之间。主要(也称为“临界”)尺寸一般均低于大约100 nm,包括在大约1-70 nm之间。在一些实施例中,至少一个主要尺寸能够是大约5 nm或更小(平均或最大值)。

[0063] 术语“大约”指的是能够在 $\pm 20\%$ 或诸如 $\pm 10\%$ 等更小值之间变化的参数。

[0064] 术语“横向”纳米通道指跨相应流体输运纳米通道的流体纳米通道。

[0065] 术语“流体输运纳米通道”指供分析的分析物流过其中的纳米通道。分析物能够是关注的任何分析物,例如包括单分析物分子,包括合成和生物高分子、纳米颗粒、小分子、DNA、核酸/多核酸、肽、蛋白质及诸如此类。通过纳米通道的输运能够使用动电学、浓度极化和/或水压(强制压力或压力梯度)来执行。

[0066] 术语“浅”指的是具有比输运纳米通道更小的深度并且比分析物高分子的水动力大小更小的纳米深度的纳米通道。相对于输运纳米通道的深度,浅纳米通道具有一般至少小一半的深度,如在大约2-100X之间。因此,例如,浅纳米通道段能够是10 nm或更短,一般在大约0.1 nm到9 nm之间,而输运纳米通道能够具有是20 nm或更大的深度(至少与浅段相邻),如在20-100 nm之间。

[0067] 浅通道段30s(图1、2A、3和5)能够是连接宽的更深纳米流体通道到输运纳米通道的低离子电阻通道。

[0068] 术语“宽”表示纳米通道具有至少是与其协作以执行分析(例如,提供驱动电压)的输运纳米通道的宽度的2X,并且更一般的情况是在3X-100X之间的宽度,如相邻协作输运纳米通道的3X、4X、5X、6X、7X、8X、9X、大约10X、大约20X、大约40X、大约50X、大约60X、大约70X、大约80X、大约90X或大约100X的宽度。

[0069] 术语“电路”指一完全硬件实施例或组合软件和硬件的一实施例。

[0070] 术语“低速”表示高分子以在大约0.1 $\mu\text{m/s}$ 到大约100 $\mu\text{m/s}$ 之间的速度通过纳米通道。

[0071] 术语“显著不同的场强”表示输运通道的一侧20s₁能够具有的场强是相同通道的第二段20s₂所具有的场强的50X-1000X,一般是100X-200X,或者输运通道的一侧20s₁能够具有的场强是相同通道的第二段20s₂所具有的场强的1/1000-1/50,一般是1/200-1/100,以

电压/cm为单位。

[0072] 术语“捕捉”表示在接入到输运纳米通道20的入口的微通道或储器中存在的分析物分子被成功引入纳米通道。

[0073] 术语“穿入”(threading)表示分析物分子初始被引入输运纳米通道20的过程,从而从微通道或储器中实现的随机线团构象(coil confirmation)提供高分子的线性化。

[0074] 术语“俘获”表示由于电场或浓度梯度原因或者由于物理障碍原因,在输运通道20内的特定位置停止分析物分子,通常在与横向纳米流体元件30的相交处或其附近。

[0075] 在一些特定实施例中,流体输运纳米通道20(图1)能够被定义为实质上与所述分析物的轮廓长度相称或超过其的导管。如果纳米通道的宽度和深度小于高分子的回转半径,则在纳米通道中分子的限制必定导致分子扩展。如果纳米通道宽度和深度大于聚合物的余辉长度(对于双链DNA为大约50 nm),则分子的扩展配置将包括一串非穿透斑点(例如,结团)。备选,如果纳米通道临界尺寸小于余辉长度,则不能自行折叠的分子能够假设反射棒构象(reflecting rod conformation)。在任一情况下,高分子沿纳米通道的长度的扩展有利于单分子表征。具体而言,DNA在纳米通道中的限制已证明对调整大小、映射、分享和表观遗传分析有用。

[0076] 通常而言,本发明的实施例提供的器件和系统允许对带电高分子(例如,DNA、RNA、蛋白质、肽、合成聚合物)到纳米流体通道的引入进行高级控制。在此方案中,纳米流体通道的相交处用于提供对输运纳米通道的离散段中电场强度的控制。

[0077] 作为简单的图示,图1中示出器件10的一个示例。在此实施例中,器件10包括通过浅纳米通道30s连接到输运纳米通道20的横向纳米流体元件30。输运通道20具有在交叉通道一侧上的段20s₁和在另一侧上的另一段20s₂。如上所述,通道的每侧30₁、30₂能够具有深度小于分析物高分子的水动力大小和输运纳米通道的深度的浅段30s。这确保高分子将在适当操作条件下不通过横向通道30迁移,而是将保持在输运纳米通道20中。浅段30s能够具有大约50到大约10 μm或更长的长度。用于相应纳米通道30的每侧30₁、30₂的浅段30s能够具有相同深度和/或长度或不同深度和/或长度。

[0078] 浅通道段30s能够是连接到更长的宽且更深的纳米流体段30w的低离子电阻通道。一般情况下,更宽、更深的段30w存在于浅段30s与储器或微流体通道30m之间。更宽、更深的段30w能够是输运纳米通道20的宽度和深度的3到100倍。

[0079] 图2A(未按比例)示出如在示例器件10中建立的输运纳米通道20的段中不同的电场强度。在与相应纳米通道30、20流体联系的四个纳米通道出口30m、20m施加的电压带有下划线。施加到输运通道微流储器或出口20m的电压分别示为0V和3V。在包括流体纳米通道20、30的器件10中,通过使用插入如本领域技术人员熟知的接入对应纳米通道的相应流体储器的宏观电极,能够施加电压。

[0080] 侧通道30具有3.5V电压每个施加到其出口30m。测量的离子电阻R指示用于通道段20s₁、20s₂和30₁、30₂。从这些值中,能够计算在相交处“1”的电压。最后,在纳米通道段20s₁、20s₂的长度L已知的条件下,能够确定电场强度F₁、F₂。在此示例中,在输运纳米通道20s₁的左侧段的输运是在左侧段20s₂中的输运快165倍快。

[0081] 第一段20s₁能够比第二段20s₂更短,一般具有是在更长段的长度的10-50%之间的长度,更一般的情况是具有在更长段的长度的10-20%之间的长度。

[0082] 图2B示出具有类似功能的不同配置的器件10,但横向纳米通道替换成与运输通道20邻接的横向电极51、52。电极51、52能够集成到器件的基板中或者附连到与运输通道20相邻的器件的基板。横向电极能够具有大约10 μm 到大约5 mm或最大大约2 cm长和/或配置成提供一般在大约1-20 V之间等适合电压的长度L。使用集成电极51、52的器件10可由于电极污染/退化而展示有限的寿命期。这可通过使用电极涂料或使用适当的防污染或耐污染电极物质而得以降低或最小化。

[0083] 这些器件10能够提供对分析物捕捉率的精细控制及对在捕捉期间施加到高分子的力及在纳米通道20内的其运输速度的精细控制。对捕捉和输运动态的此控制能够通过在不同模式中的器件操作实现,模式的性质由纳米通道尺寸和操作条件确定。在能够描述为分压器的一种操作模式中,通过选择相对纳米通道宽度、深度和长度,设计每个流体路径的电阻。每个纳米通道中的场强还由在每个纳米通道出口施加的电压控制。

[0084] 图2A和2B示出在位于相交处I左侧的运输纳米通道的部分中高场强已知的情况下,此操作模式能够如何用于捕捉在高频率的分子的示例。一旦高分子迁移通过相交处,其速度便大幅降低,这是因为它由在位于图2A和2B中相交处右侧的运输纳米通道的部分中的更弱电场驱动。分压器的操作模式也能够使用集成电极而不是横向流体元件实现(图2B)。此类电极51、52(包括诸如金属、传导聚合物、传导陶瓷等传导物质)用于控制在电极/纳米通道相交处I的电压。低速度运输可用于对高分子的“快速”(on-the-fly)表征,这是因为它确保分子采用平衡构象,并且时间分辨率有限的检测方法能够用于分析。

[0085] 图3A和3B是器件10的示意图,器件包含设计用于使用浓度极化,实现到纳米通道20的聚合电解质引入和随后的捕捉的至少一个纳米通道20。阳离子为橙色,并且阴离子以绿色示出(在黑白版本中,带有阴影标记)。图3A以示意图方式示出在未施加电压到器件时的离子分布。图3B示出在运输纳米通道的出口(V1)和在两侧通道30₁、30₂(V2)施加正电压时的离子分布,示出阴离子富集和耗竭。

[0086] 在某一示范操作模式中,选择纳米尺寸和缓冲液条件,使得浓度极化出现在纳米通道相交处I。对于带负电荷表面的纳米通道(例如,以石英基板制成的纳米通道,并且缓冲液pH高于表面硅烷醇基(surface silanol group)的pK_a),能够增强在相交处I的阴离子的浓度,同时耗竭阳离子的浓度。实现此条件表示横向纳米通道30足够浅和/或缓冲液的离子足够低,足以在这些纳米通道内实现双电层的重叠。浓度极化在图3A和3B中以示意图方式示出由于在此配置中的浓度极化,诸如DNA和RNA等聚阴离子高分子能够通过高场强被驱动到运输纳米通道中,并且随后在纳米通道相交处被捕捉。无论分子是在相交处I被捕捉还是在通过相交处后被动态减慢,在动态方面的更改为调整电压提供了足够的时间,以便通过任意速度和方向性,精确控制通过纳米通道的高分子运输。在图4A-C中示出了显示此类操作的配置的示例。

[0087] 如图3A和3B中所示,浅通道段30s能够具有重叠的双电层。如本领域技术人员熟知的一样,在带电表面(二氧化硅表面在pH > 3时带有负电荷)接触溶液时,它将吸引相反电荷的离子(即,玻璃吸引正离子)。这些离子的存在屏蔽了表面电荷。在靠近带电表面处,能够存在带相反电荷离子的层,该层具有在局部比在主体溶液中更大的浓度。这称为双电层(EDL)。存在与EDL相关联的特性长度,称为德拜长度。如果溶液中的离子远离表面,大于此德拜距离,则表面电荷被完全屏蔽。如果它更靠近表面,小于德拜长度,则离子遇到与表面

的静电相互作用(即,如果它具有相反电荷,则它将被吸引到表面,或者如果它具有相同电荷,则将被排斥)。德拜长度随溶液离子变化,并且对于在浅纳米通道中的低离子强度溶液,出现相对表面的双层重叠的状况。由于电荷排斥,如果离子与纳米通道壁具有相同电荷极性,则存在抵制效应,从而降低纳米通道中离子的浓度。相反,由于电荷吸引,如果离子具有纳米通道壁的相反电荷极性,则存在增强效应,从而增大纳米通道中离子的浓度。在跨与输运纳米通道20相交的浅横向纳米通道30施加电压时,由于通过浅纳米通道的带相对电荷离子的不同输运率原因,出现“浓度极化”。具有带负电荷通道壁的器件能够形成其中能够捕捉带负电荷离子(像NDA)的区域和其中排除带正电荷离子的区域。具有带正电荷通道壁的器件形成其中能够捕捉带正电荷离子(像一些蛋白质)的区域和其中排除带负电荷离子的区域。

[0088] 图4A-C显示用于具有适当大小的纳米通道30的相交处I的器件的操作的三个阶段。施加正偏置到未包含(聚)阴离子(“M”)的纳米通道储器产生分析物注入和捕捉(图4A)。去除所有偏置促使分子M驰豫,进入某个平衡构象(图4B)。只跨输运纳米通道施加偏置将控制通过纳米通道的易位(图4C)。此输运步骤能够使用两种不同的操作模式实现。在第一模式中,在使横向浅纳米通道30₁、30₂中的电极浮动(即,未施加电压,电极也未接地)时,跨输运纳米通道(V₁,V₂)施加电压。在第二模式中,在使横向浅纳米通道30₁、30₂(V₃,V₄)中的电极接地时,跨输运纳米通道20(V₁,V₂)施加电压。

[0089] 纳米通道很适合多个应用,包括单分子检测和鉴定、生物聚合物的限制和操纵、生物测定、多核苷酸的限制映射、DNA大小调整、基因组测序的物理方法及限制物理(physics of confinement)的基础研究。

[0090] 预期许多这些应用的成功实现将要求小心控制在纳米通道内的分子动态,包括分子输运的速度和通过纳米通道驱动分析物分子的频率。通过比分子的回转半径更小的纳米流体导管从宏观和微观储器输运高分子要求应用驱动力(例如,水力、静电、重力)以克服能量障碍。此障碍在性质上主要是熵性的,并且从分子的构象自由度在从自由溶液移到受限纳米通道中的降低中推导。另外,成功输运事件的概率与在有利于穿入的构造中分子与纳米流体导管的入口有冲突的可能性成正比。这些基础条件的实际暗示是在施加有限的阈值驱动力前,分子输运不进行。必要力的量值可相当大,导致分析物的输运以高速度通过纳米通道。能量障碍阻止以更低速度驱动输运,这对于许多应用是合乎需要的。另外,对大的高分子应用大力可在捕捉过程期间诱发分裂。这两个限制均能够通过使用如上所述纳米流体器件而得以克服。在其引入输运纳米通道期间牵拉在高分子上的总力随纳米通道中的场强和输运纳米通道的高场段内包含的带电荷单体的数量而变化。因此,通过控制施加的电压或纳米通道的高场段的长度,可调整此力。

[0091] 这对于诸如基因组DNA等极长高分子的纳米通道限制特别重要。例如,假设将人的染色体DNA引入中心长100-nm的直径纳米通道。用于人染色体DNA的中位长度是大约130 Mbp(百万兆基对)。回转半径为大约80 μm时,此长度的DNA具有相当大的构象熵。克服熵障碍和将DNA拉入输运纳米通道中将要求大约每厘米10 kV的估计阈值场强。这能够通过跨1-cm长纳米通道施加10 kV,或者通过在诸如此处所述那些器件等注入器件的出口施加10-20 V而得以实现。如果输运纳米通道的高场段是1 μm长,则在穿入期间施加到DNA分子的总力在注入器件中小至1/10⁵倍(在高场区域中包含大约5 kbp)。这大大降低了DNA分裂的概率。

图4D和4E以示意图方式示出到纳米通道的DNA引入(拉入)和分别基于有和没有横向通道的长纳米通道,施加到DNA分子的相应计算的力, $F(t,E)=\lambda_q L(t)E$ 和 $F(t,E)=\lambda_q [LE+L'(t)E']$ 。等式的组成在下面列出。

[0092] E = 电场强度

[0093] $F(t,E)$ = 在给定 E 上在时间 t 在DNA分子上的力

[0094] λ_q = DNA的线性电荷密度

[0095] $L(t)$ = 在时间 t 在纳米通道中DNA的长度

[0096] L = 示范器件的第1段的长度

[0097] E' = 在示范器件的第2段中的电场强度

[0098] $L'(t)$ = 在时间 t 在示范器件的第2段中DNA的长度

[0099] 为计算在DNA分裂或中断前能够拉入纳米通道中的DNA量(长度),假设了双链DNA的抗张强度为大约480 pN。请参阅由Bensimon等人在Phys.Rev.Lett.1995,74,4754-4757所著内容,其内容由此结合于本文中,如同其全文在此陈述。例如,如果 $E=200V/cm$,并且 $L=10\mu m$,则在无横向通道的情况下(图4D),能够拉入纳米通道的DNA的最大长度是大约3Mbp。相反,在横向通道被包含到器件中时(图4E),能够拉入纳米通道的DNA的最大长度是大约577 Mbp,即,在长度上比人的染色体1更长。

[0100] 示范器件制作

[0101] 图5A和5D中显示了一种器件配置。对于这些配置,统一的特性是各种纳米通道20、30尺寸。通过其驱动分析物运输的纳米通道20的横向尺寸能够在这些示例中是大约20-100 nm,并且具有接近1的纵横比(宽度:深度)。与运输纳米通道20相交的浅通道30s能够具有在大约1到10 nm之间的临界尺寸(深度)。如上所述,两个考虑事项预示器件设计的此元素。首先,相对于运输纳米通道尺寸,更小的尺寸阻止分析物高分子通过这些导管的不需要运输。其次,这些尺寸与低离子强度缓冲液中双电层的德拜长度特性相称,从而意味着在诸如1X TBE等标准电泳缓冲液中能够诱发浓度极化(89 mM三羟甲基氨基甲烷(Tris);89 mM硼酸盐(borate);2 mM乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA))。如果不需要浓度极化,则使用更深的横向纳米通道30和更高的离子强度缓冲液。

[0102] 图5A中显示的器件10能够借助于由其相对电阻确定的通过各种纳米通道的场强(图5B),通过单个施加的电压 V 的控制来操纵分析物分子。信道尺寸经选择,以在相交处之前和之后的运输纳米通道的部分之间实现相当大的电压降。第二更灵活的器件设计在图5D(类似于上面相对于图1、2A显示和讨论的器件)中显示。此处,存在相同元件,但相交纳米通道30₁、30₂可单独寻址,从而允许高分子运输的精确控制。

[0103] 图5A示出纳米通道20在相交处I合并到纳米流体通道30中,形成两个段(短的20s₁和长的20s₂)。在此实施例中,两个段30₁、30₂大致平行,并且沿长的段20s₂的长度延伸。在此实施例中,通过跨纳米通道网络应用单个电压,能够控制高分子运输。

[0104] 浅通道段30s能够是在相交处I将与段20s₂长度相同或大致相同的纳米通道30₁、30₂的更长、更深的宽纳米流体段30w连接到运输纳米通道20的低电阻通道。更宽、更深的纳米通道30w经配置,以便在段20s₁内降低大部分电压,从而在段20s₂中产生更低得多的场强度(即,对于低速度或无流动(捕捉), $F_2 \ll F_1$)。

[0105] 图5B是指示通过图5A的纳米通道的离子电阻的等效电路图。图5C是图5A中显示的

器件的倒置SEM图。

[0106] 图5E是四储器器件的SEM图像。

[0107] 流体纳米通道能够使用多种技术制成,包括聚焦离子束(FIB)研磨、电子束光刻、纳米压印光刻、光刻、制模或塑造策略。这些方法适用于多种基板物质,从而允许以玻璃(二氧化硅)、石英、硅、陶瓷、金属、塑料等制作器件。

[0108] 就此处所述器件10作为本发明的示例而言,电子束光刻和FIB研磨的组合用于为纳米流体元件构形。首先,使用标准光刻和蚀刻技术制备微流体通道。这些微通道经喷粉(powder-blasted)通孔接入。随后,通过使用电子束光刻为特征(feature)构形,来定义浅横向纳米通道。使用湿化学蚀刻,将特征蚀刻1-10 nm到石英中。备选,忆使用上面列出的多种方法将这些元件构形。通过在30 kV操作的Ga⁺离子源,在Helios NanoLab DualBeam仪器(FEI公司)上使用FIB研磨制作输运纳米通道。接着,通过对大的(5 μm宽x 2 μm深)低电阻通道进行FIB研磨,将浅通道连接到微流体通道。图5C和5E显示在这些元件已构形后装置的SEM图像。最后,去除在各种定型步骤中要求的基板表面上的任何薄膜层,并且通过使用诸如熔融胶合、阳极键合或胶接等几种可能方法之一,以罩盖密封器件,封闭流体网络。图5F是另一示范器件的SEM图像。器件的通道狭缝(channel-slit)接口(输运和浅横向纳米通道)完全使用FIB研磨制作,以生成如上所述是另一可选制作技术的研磨通道狭缝接口(不要求电子束光刻)。图5G是器件的倒置SEM图,其中,输运纳米通道和单个浅横向纳米通道只使用FIB研磨制作。图5H是图5G的流体组件的原子力显微镜分布图,从中能够确定精确的纳米通道深度。

[0109] 注入/捕捉器件中浓度极化的确认

[0110] 为确认在带有相交纳米通道的器件的操作期间发生浓度极化,在图5A中显示的器件类型的操作期间,测量阴离子荧光染料荧光素的浓度分布图。荧光素的10 μM溶液以0.5X TBE缓冲液(89 mM三羟甲基氨基甲烷;89 mM硼酸盐;2 mM乙二胺四乙酸,EDTA)制备。此溶液被引入接入纳米流体网络的两侧的微流体通道。在倒装显微镜上安装器件,并且记录纳米流体通道的荧光图像。跨如图6A中指示的纳米通道施加电压。在未施加电压时和在跨纳米通道施加电压并且允许染料响应后,收集图像。通过从在施加电压时收集的一个图像减去零偏置荧光图像,显现荧光浓度增强和耗竭的区域。图6B显示这些不同图像之一,它清楚地指示浓度极化的存在。

[0111] 图6A显示注入/捕捉器件的明场光学显微镜图像。图6B是荧光显微镜图像,根据本发明的实施例,示出在跨纳米通道网络施加4 V时在0.5X TBE缓冲液中荧光染料的浓度增强和耗竭。

[0112] 注入/捕捉器件中DNA输运的控制

[0113] 在诸如图5A中显示的带有单个电压控制的器件中,通过如图7所示操纵浓度极化,能够控制输运。通过应用足够大的正电压,进行DNA的注入。DNA穿入输运纳米通道中,并且快速地迁移到捕捉它的纳米通道相交处。

[0114] 图7显示一系列的帧,显示了通过类似于图5A中显示的器件的λ-DNA的捕捉和随后输运。如DNA的强俘获表明的一样,存在浓度极化。帧率是每帧200 ms。箭头指示施加了所注电压。

[0115] 如在图7中明白的一样,俘获力导致分子的压缩。在去除施加的偏置时,两个力在

分子上起作用,导致瞬态响应。第一个力是在俘获期间在分子上强加的压缩力的松弛。第二个力是离子浓度分布图的平衡。此后一力的作用通常确保DNA分子漂移到在纳米通道的注入段的相对侧上的输运纳米通道。此时,施加小的负电压将产生向负电极的DNA输运。此输运与预期用于带负电荷的DNA的电泳的方向相反。它源于从纳米通道相交处沿阴离子耗竭的前方的DNA输运。

[0116] 电动驱动的高分子输运的增大控制也能够在此条件下在带有单个电压控制的器件中实现,如在图5A中显示的器件。在电解质溶液的离子强度高和/或相交纳米通道较深时,此条件能够出现。这些条件排除或最小化了双电层重叠,并且产生弱或可忽略的俘获。在此情形下,由于纳米通道网络(图5B)中的电阻原因,在输运纳米通道20的注入20s₁和输运20s₂段中在电场强度方面仍存在相当大的不同。因此,虽然在通过纳米通道相交处并且进入输运纳米通道的输运段中时DNA分子速度大幅降低,但在高场强能够注入DNA分子。通过改变器件中的通道尺寸和由跨纳米流体网络施加的电压的量值控制的绝对值,能够控制电场的相对强度。图8中示出记录在此操作模式中受控的易位的荧光图像。在此器件的操作期间,施加的电压相对于时间保持恒定。

[0117] 图8显示一系列的帧,显示了通过类似于图5A中显示的器件的 λ -DNA的输运。跨纳米流体网络施加了4V的偏置。实验使用更高离子强度缓冲液(10X TBE)执行以减少DNA捕捉。帧率是每帧4 ms。

[0118] 图5D中显示的器件类型提供对DNA输运的另外控制。由于两侧纳米通道可单独寻址,因此,DNA俘获力的强度能够从弱调到强。在俘获后,能够去除跨侧纳米通道的电压,并且器件充当单个纳米通道,其中,输运由电渗力或电泳力确定。这些力具有在位置上不变的量值,意味着恒电压的应用将产生恒定输运速度。因此,此配置比其中输运取决于浓度梯度的演进的具有单个电压控制的器件提供更大的控制。此控制在显示能够关闭和打开单个DNA分子的输运的图9A中示出。

[0119] 图9A是一系列的帧,显示了对由与图5D中显示的装置类似配置的装置启用的输运的控制。DNA保持固定或者通过20 nm x 20 nm(宽度x深度)输运纳米通道低速输运。帧率是每帧200 ms。图9B是实验确定的DNA输运吞吐量和速率的曲线图(事件/s与输运速度(cm/s)),根据本发明的一些特定实施例,在具有图5D中显示的配置的器件中使用通过V横向[V5=V6]/V输运[V2, V1=0]的各种比率的电压控制,示出DNA输运的可调谐控制。显示的比率包括相对于无V控制(底线)的1、0.75和0.5。

[0120] 本发明的实施例提供生成大注入电场的有源器件,电场能够启动高频率的输运事件,同时一旦在输运纳米通道中限制高分子,便允许对分析物输运的精细控制。这被认为是本文所述器件类独特的能力。浓度极化已在纳米流体器件中用作分析物预浓缩的方法,但尚未有如本文中所述在单分子研究或器件中使用的报告。具有类似于此处使用的浅纳米通道等外设组件的纳米流体器件已被证明对使用压力驱动流为纳米流体通道加载高分子是有用的。电力比通过纳米流体网络的压力更易于平衡和控制。

[0121] 本发明的实施例提供的器件、方法和系统的潜在使用范围宽广。由于对输运驱动电场和俘获动态的增大控制,能够实现以更低速度通过纳米通道的高分子输运。这预期将允许对单个受限分子进行更精确的光学和电气测量。一个示例是在连接到相对隧穿探头的纳米通道中DNA分子的测序,其中,通过测量经过单独核苷酸的独特隧穿电流,实现碱基识

别(base calling)。展示了例如将允许在任一方向和以各种速度的输运、单分子的多次通过棘齿状逐碱基移动(ratcheted base-by-base movement)的控制程度。所述器件预期也对于将长的完整高分子引入纳米流体通道是有益的。此能力将允许例如端对端表征DNA的整个染色体的价值。

[0122] 图10A-10C示出与一个或更多个交叉通道30具有一个或更多个相交处,配置成在输运通道20的端部选择性地应用电气偏置V1、V2、V3、V4,并且在横向纳米通道30的端部选择性地应用电气偏置V5、V6、V7、V8的流体分析器件10的备选几何形状。白色通道指示正常通道深度/大小,带条纹图案指示浅通道段30s。

[0123] 图11A-11C示出与横向电极51、52的一个或更多个集相交,以在输运通道20的端部选择性应用V1、V2、V3、V4,并且在横向纳米通道51、52的端部选择性地应用电气偏置V5、V6、V7、V8的流体分析器件的备选几何形状。

[0124] 通道30和横向电极51、52及一个或更多个输运通道20的组合能够在诸如流体分析芯片(未示出)等流体器件10上使用。

[0125] 纳米漏斗(Nanofunnel)也可与如共同待审PCT/US2013/025078中所述的流体通道的一个或更多个通道一起使用,该申请的内容通过引用结合于本文中,如同其全文在此陈述。

[0126] 图12和13示出能够包括电源190的示范电路50,电源能够电施加例如电压等电气偏置到通道段20、30或横向电极51、52。输运通道20和/或流体交叉通道30的一个或两个端部能够合并到配置成保持诸如流体(电解质)等可流动物质的储器中。储器流体能够包括电解质溶液,例如,高离子强度电解质溶液。储器和通道30能够包括与输运通道20相同的流体,例如,相同浓度的电解质溶液或不同浓度的电解质溶液。适合溶液的示例包括但不限于浓度在大约35 mM到大约1 M的氯化钾溶液。备选或另外,在通道30中,相对于在输运通道20中的溶液,能够使用更高(或更低)离子强度可流动物质、液体或溶液。能够用于相应通道30的其它流体物质包括有机溶剂中的两亲性电解质、在感应通道中形成的胶状电解质溶液、传导聚合物、离子液体、低熔融温度金属和合金(例如,“液态金属”)。

[0127] 也可使用不同可流动物质的组合。在输运通道20与不止一个通道30相交的一些实施例中,每个通道30可包括不同的可流动物质或相同的可流动物质。在一些实施例中,相应通道30具有与另一通道30在相同浓度或在不同浓度的相同电解质溶液。在一些实施例中,流体物质在被引入通道30后能够转换成固态或半固态物质。例如,凝胶能够交联,聚合物能够聚合,并且金属通过使器件操作温度降低到低于金属的熔融点而被固化。在其它实施例中,通过使用本领域技术人员熟知的镀层或生长量法(例如,金属的电镀或无电镀),能够与用于横向电极51、52的输运通道相邻生长嵌入式电极。

[0128] 参照图12和13,电路50能够包括第一和第二电极251、252,两个电极与相应通道30的端部30e保持通信并且相隔紧密或者间隔分开,在相应输运通道20的每侧上一个电极。电路50能够包括电源190(例如,电压源和/或电流源),电源能够通过所需定时算法或定时电路90c,在至少一个处理器90p的指导下应用电气偏置。电路50能够在适当的时间施加电压V1、V2、V3、V4以注入、捕捉或俘获和输运在分析的分子。

[0129] 图12示出电压更改的光学触发,并且图13示出电压更改的电气触发。图13显示电路50能够包括至少一个处理器90p和电流表60,电流表能够监视在输运通道20中的分析物

通过位于与通道30的相交处I前的段20s₁中的横向电极151、152时,与分析物相关联的离子或隧穿电流扰动。部分或所有电路50能够存在于器件10(例如,芯片或基板)上,或者部分可存在于(有线或无线)连接到器件10的远程器件中。在一些实施例中,电源190能够以可释放的方式与器件10接合。

[0130] 图12和13也示出电路50能够包括带有电路和/或至少一个处理器90p的计算机90,计算机能够获得用于输运通道20中分析物的分析数据。术语“计算机”在广义上用于包括一般有至少一个数字信号处理器的任何电子器件,从而允许控制和与电路50联系以控制操作。计算机可在有器件10的站点本地或与其远离。

[0131] 图13显示电路50能够包括数字化器80和带有显示屏的计算机90。这些组件可以是组合或离散组件。图12也示出在一些实施例中,电路50能够包括带有检测器220和激励源205的成像系统200,成像系统能够拍摄在输运通道20中分析物分子的一系列图像。成像系统200能够是任何适合的成像系统。如图所示,系统200能够包括激励光源205(一般用于生成激励荧光标记分子的光)(能够选择性地包括反射镜和棱镜或其它物镜)和诸如摄像头、光电倍增管或光电二极管等图像生成装置或检测器220。物镜/棱镜在使用时能够存在于器件10的主表面之下或之上。电输入/输出和流操作能够存在于器件10的相对侧上。器件10也可翻转以在其侧面操作(平坦的主表面向上或成一定角度),而不是如图所示大质水平。

[0132] 在一些特定实施例中,器件10能够使用在Menard等人所著“使用聚焦离子束研磨在绝缘基板中制作小于5 nm纳米通道”(Fabrication of Sub-5 nm Nanochannels in Insulating Substrates Using Focused Ion Beam Milling, Nano Lett.2011, 11, 512-517)(2010年12月20日发布)和2010年9月21日提出,题为“用于形成纳米通道的方法、系统和器件”(Methods, Systems And Devices For Forming Nanochannels)的美国临时专利申请61/384738中描述的方法,其内容通过引用结合于本文中,如同其全文在此陈述。也就是说,形成流体分析器件的方法能够包括:(a)提供具有厚覆盖层的基板;(b)通过覆盖层研磨至少两个等分通道到基板中;(c)去除覆盖层;以及(d)响应研磨和去除步骤,在基板中形成至少一个流体输运纳米通道和带有浅段的至少一个流体纳米通道,使得浅段或在相交处与输运通道相邻的集成横向电极定义通过显著不同场强能够操作的输运通道的长段和短段。

[0133] 引用覆盖层时的术语“厚”表示覆盖层(例如,单层或多层结构)能够具有至少为50 nm的“TH”,一般在大约50 nm到大约500 nm之间,并且更一般而言在大约100 nm到大约400 nm之间。覆盖层能够是单片材料层,或者可以是多个堆栈附连层。覆盖层能够导电,并且配置成提供所需低溅射率。低溅射率一般小于大约 $1.0 \mu\text{m}^3/\text{nC}$,更一般而言为 $0.5 \mu\text{m}^3/\text{nC}$ 或更小,如大约 $0.10 \mu\text{m}^3/\text{nC}$ 、大约 $0.23 \mu\text{m}^3/\text{nC}$ 和大约 $0.30 \mu\text{m}^3/\text{nC}$ 。对于单片覆盖层结构,覆盖层能够是金属性的,如包括铝的层。覆盖层能够经配置,以便它与基板上表面不起反应。

[0134] 虽然出于完整性目的,描述了FIB研磨,并且认为它特别适合用于形成纳米通道,但其它实施例涉及其它形成技术,如上所述,例如包括电子束光刻、纳米压印光刻、光刻、制模或塑造策略及本领域技术人员理解的其它方法。

[0135] 通过纳米通道的纳米流体实现很适合多个应用,包括单分子检测和鉴定、生物聚合物的限制和操纵、生物测定、多核苷酸的限制映射、DNA大小调整、基因组测序的物理方法及限制物理(physics of confinement)的基础研究。

[0136] 上述内容是说明本发明,而不要视为是其限制。虽然本发明的几个示范实施例已描述,但本领域的技术人员将容易理解,在实质上不脱离本发明的新颖示教和优点的情况下,在示范实施例中可实现许多修改。相应地,所有此类修改要包括在如权利要求定义的本发明的范围内。本发明由随附权利要求及将包括在其中的权利要求的等效物定义。

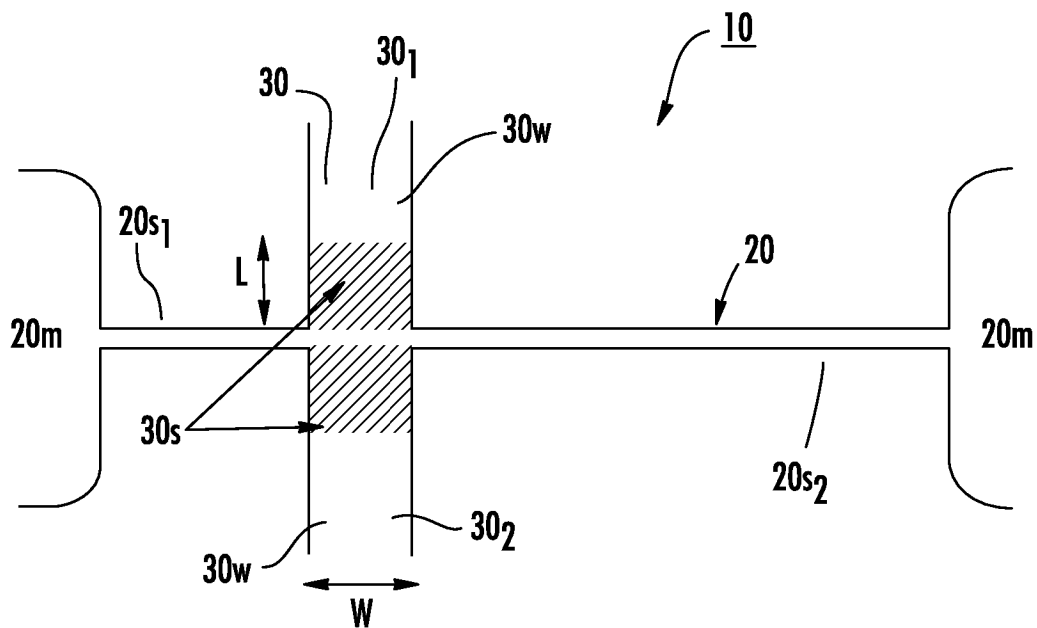


图 1

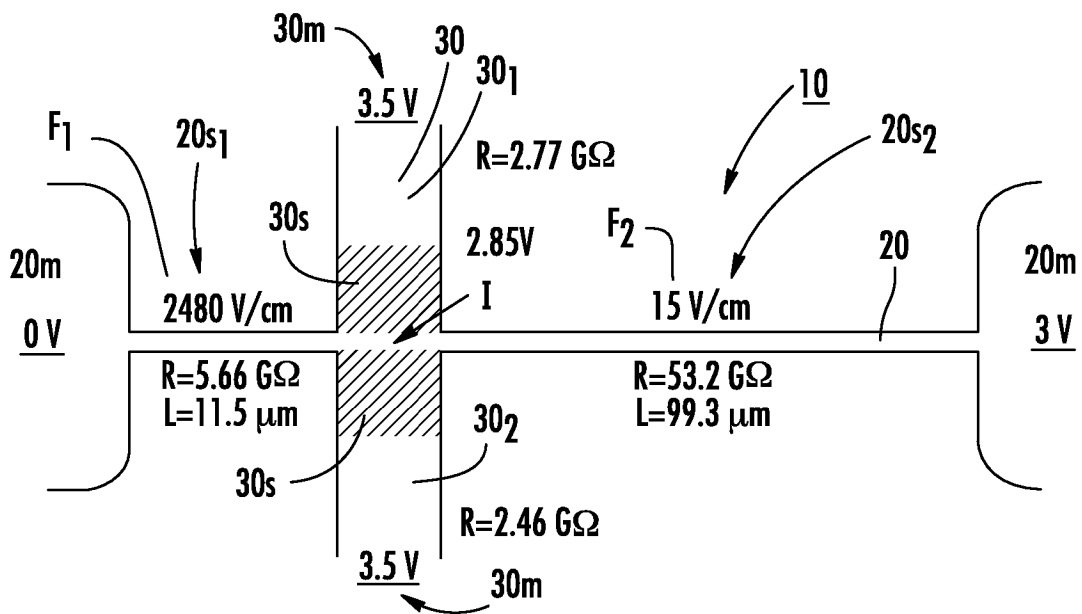


图 2A

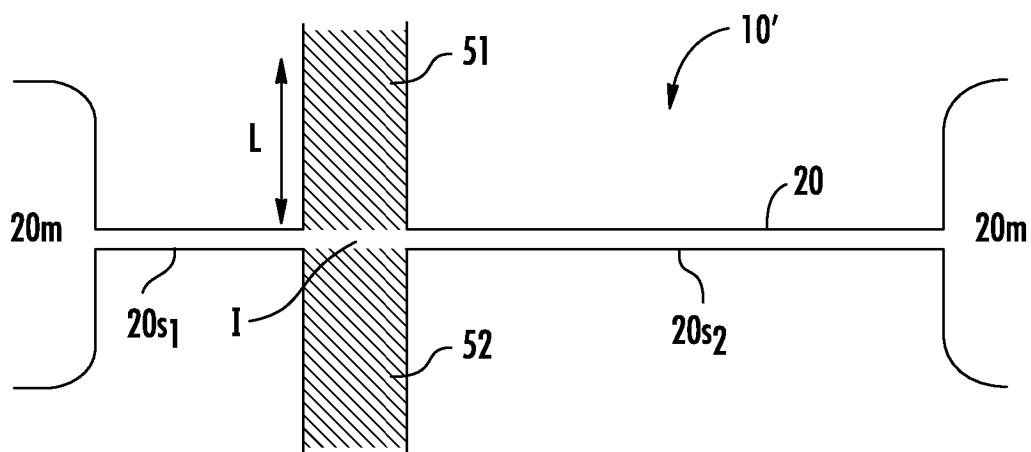


图 2B

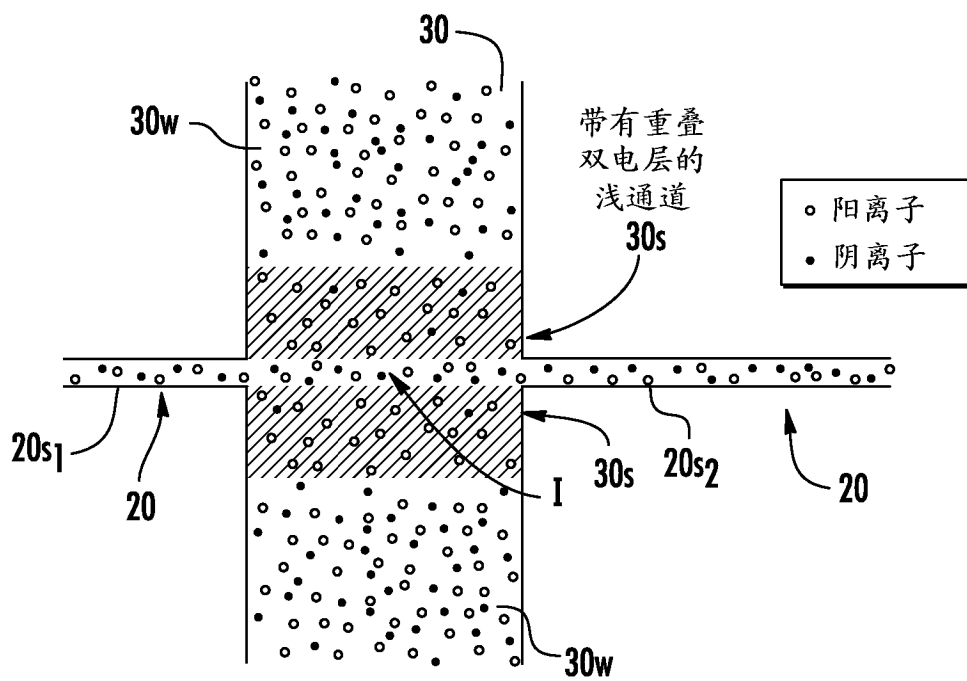


图 3A

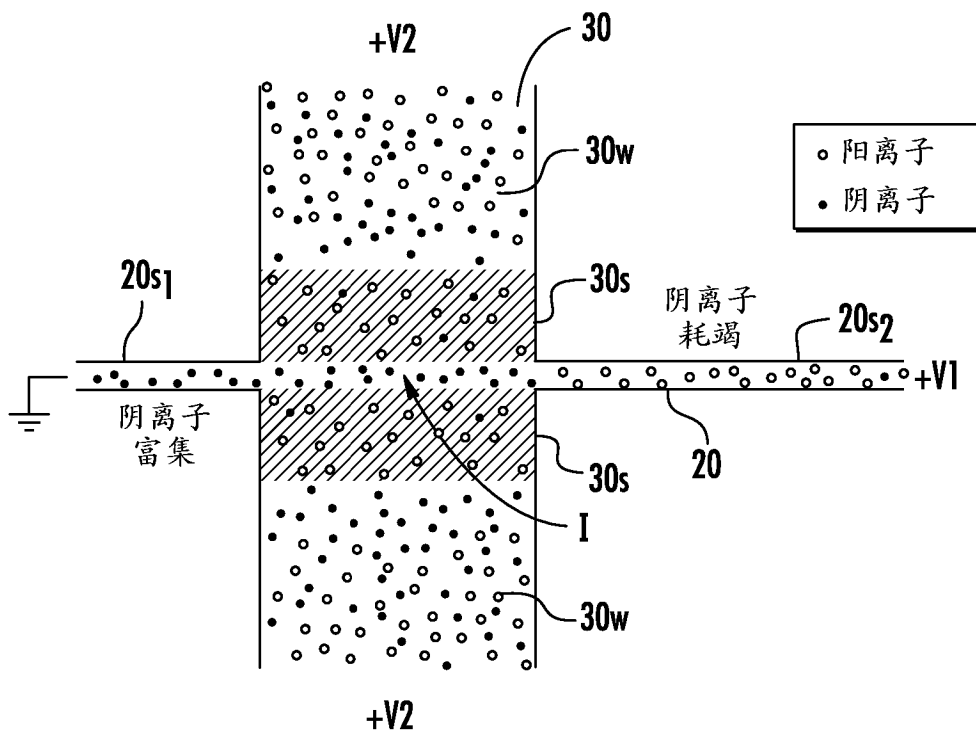


图 3B

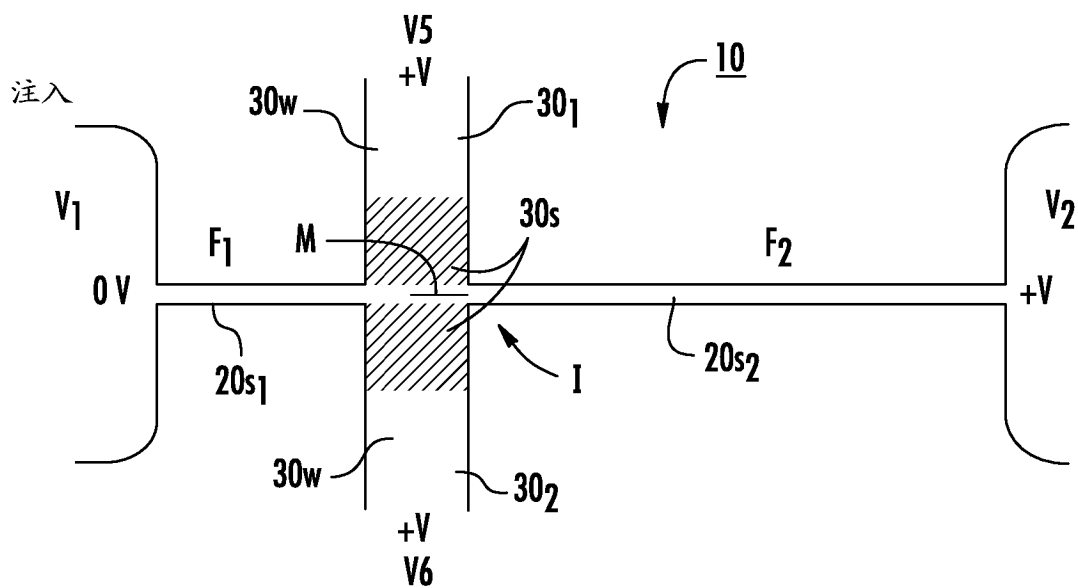


图 4A

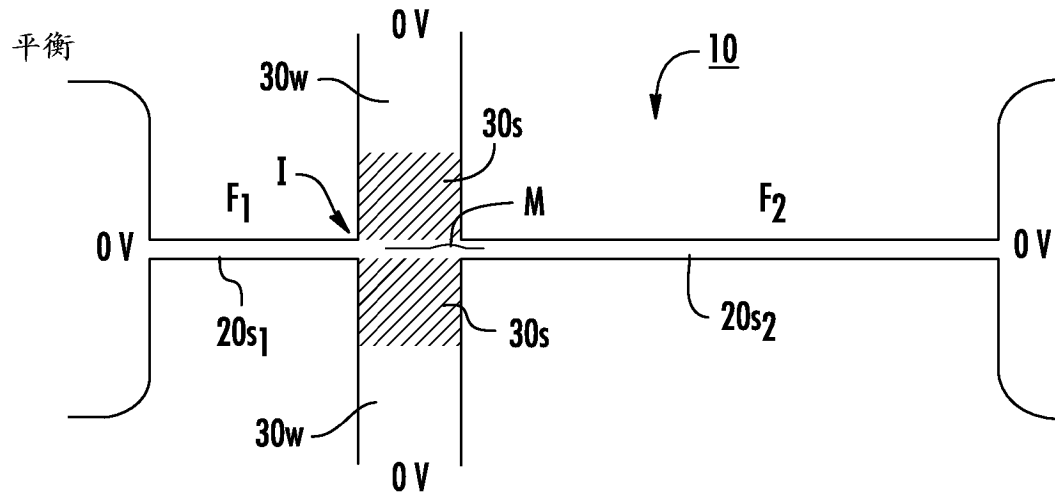


图 4B

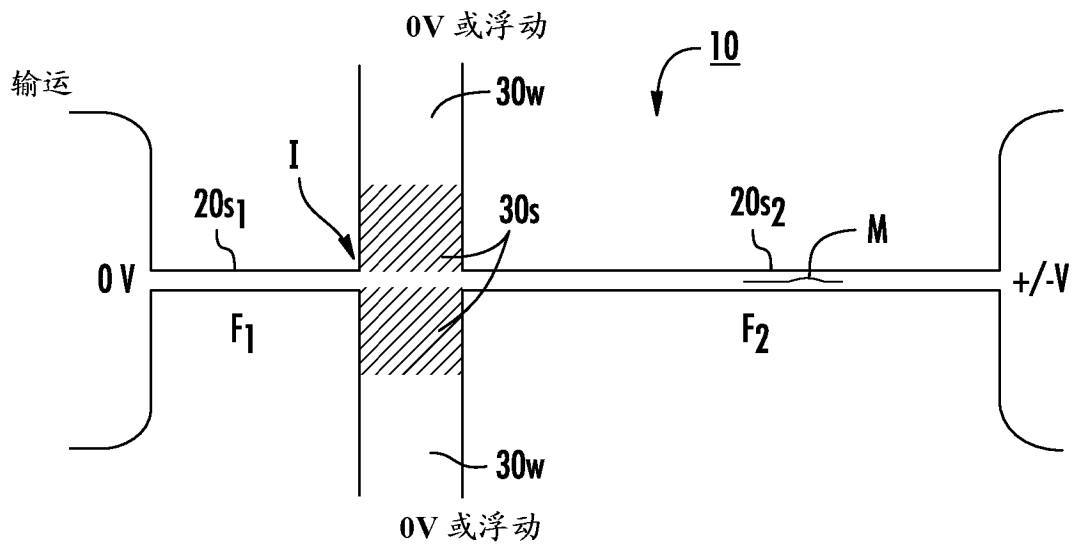


图 4C

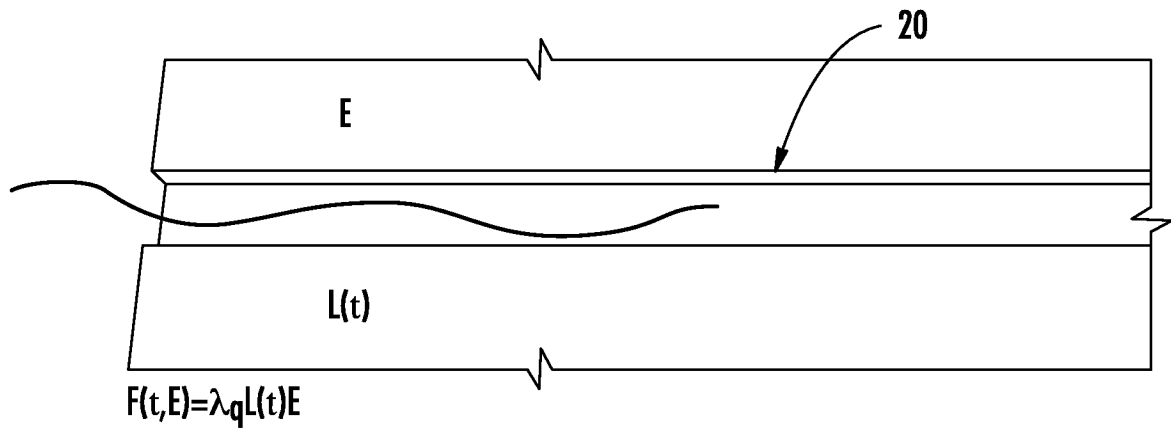


图 4D

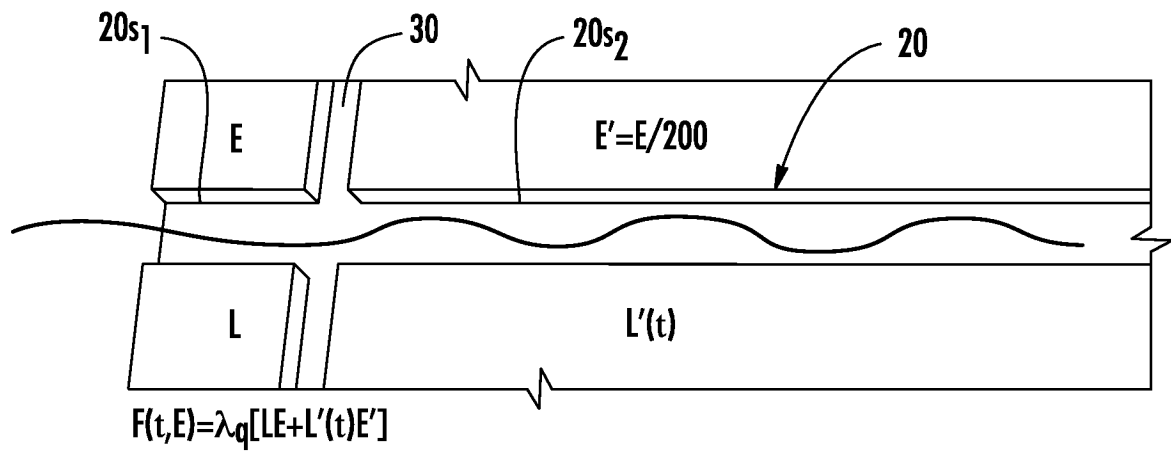


图 4E

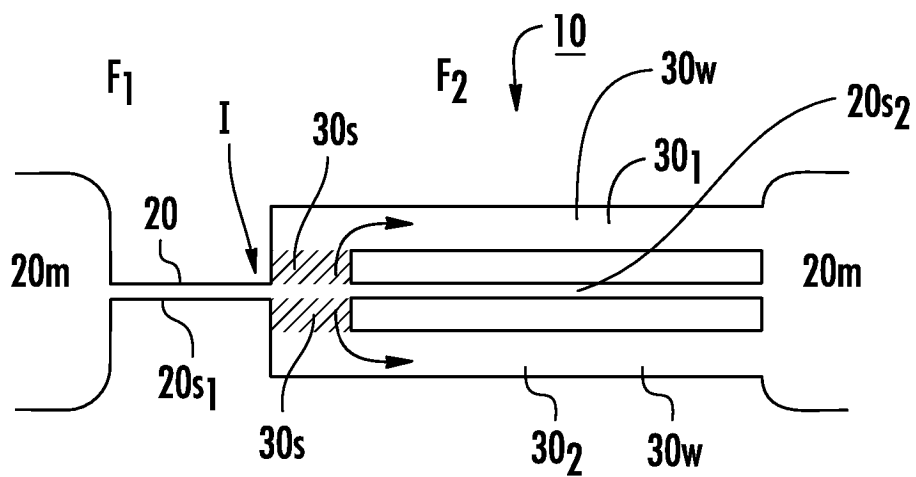


图 5A

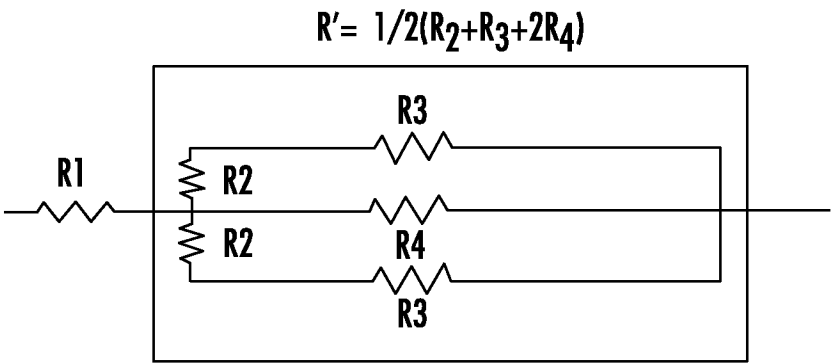


图 5B

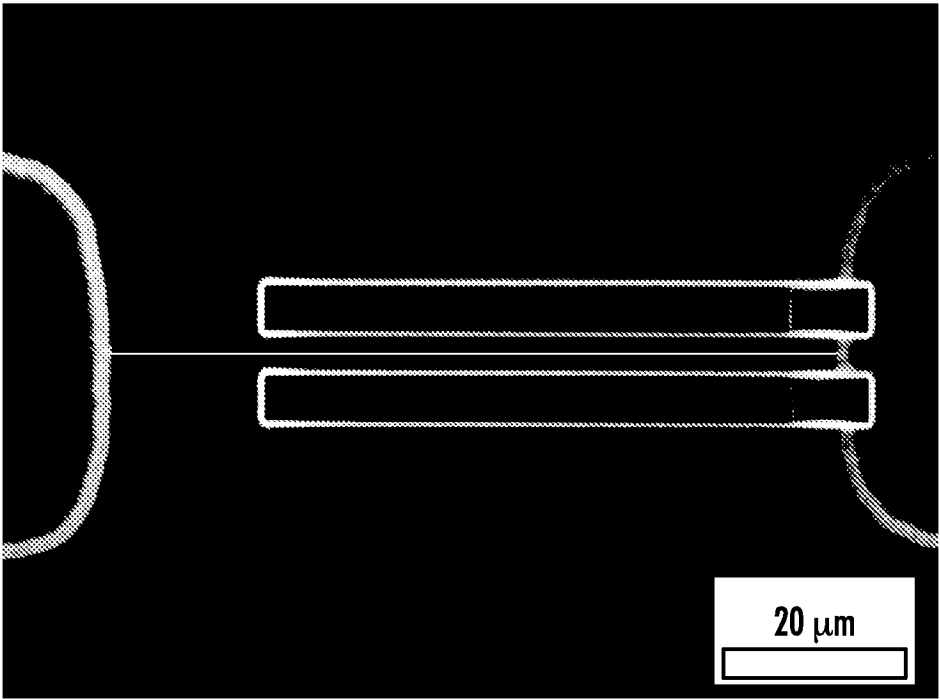


图 5C

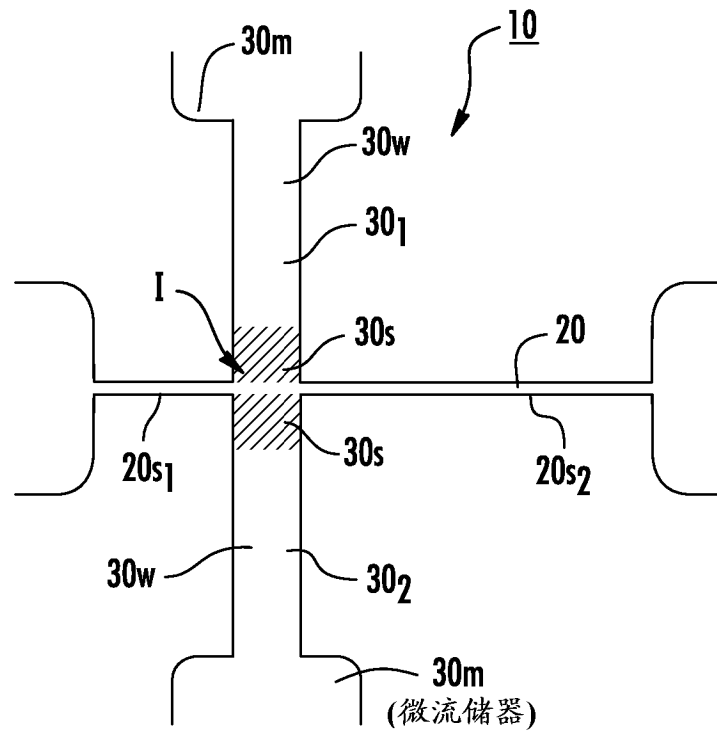


图 5D

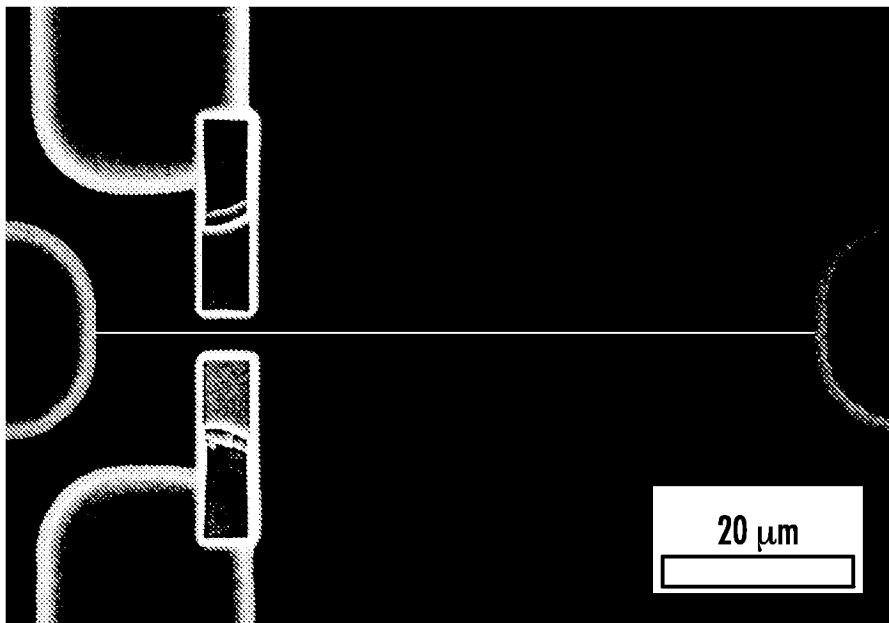


图 5E

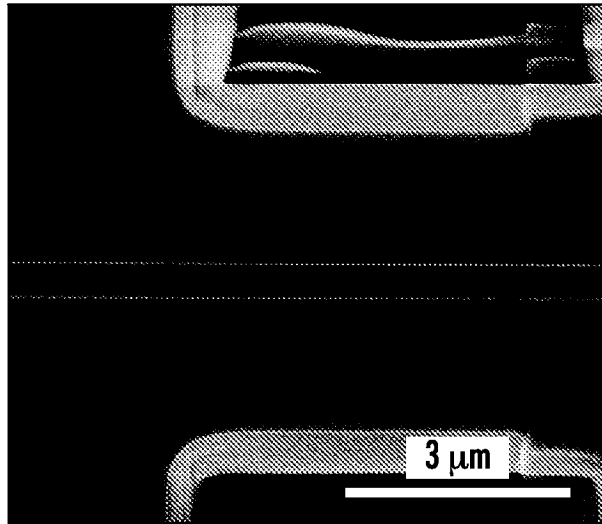


图 5F

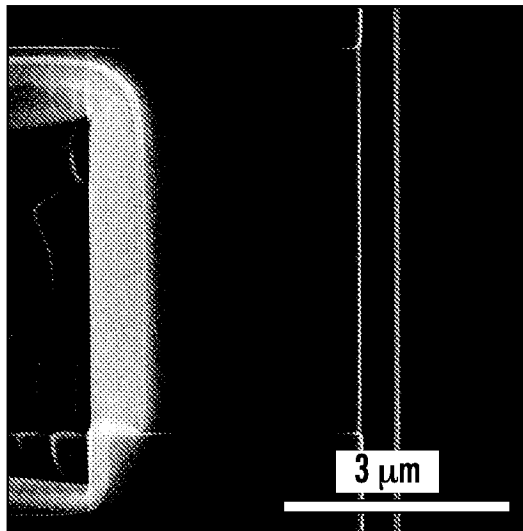


图 5G

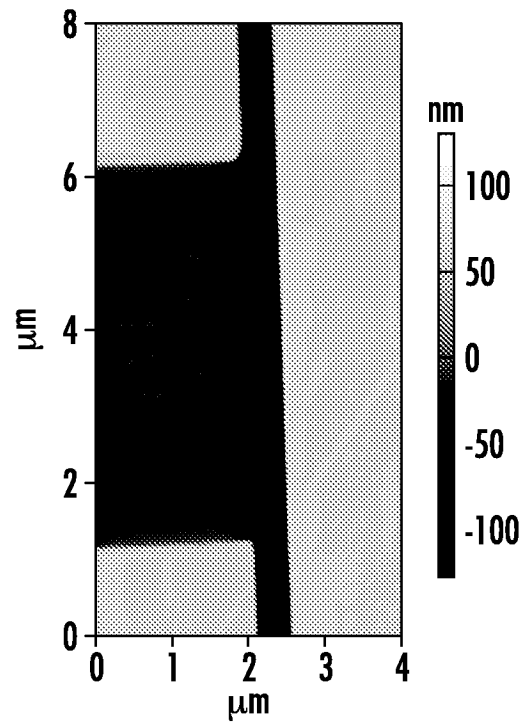


图 5H

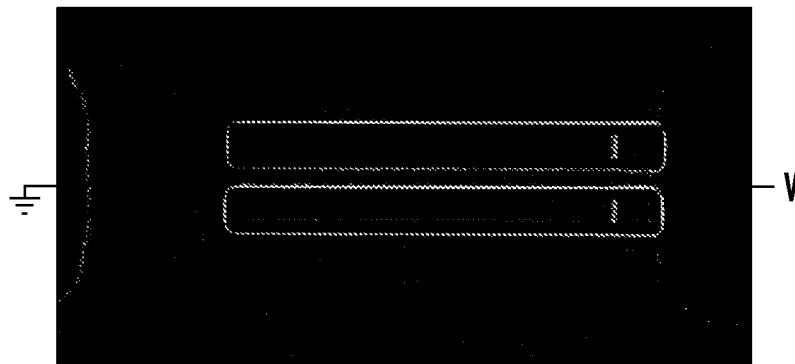


图 6A

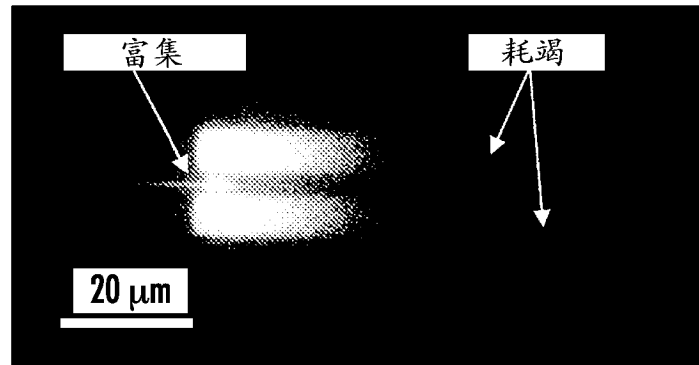


图 6B

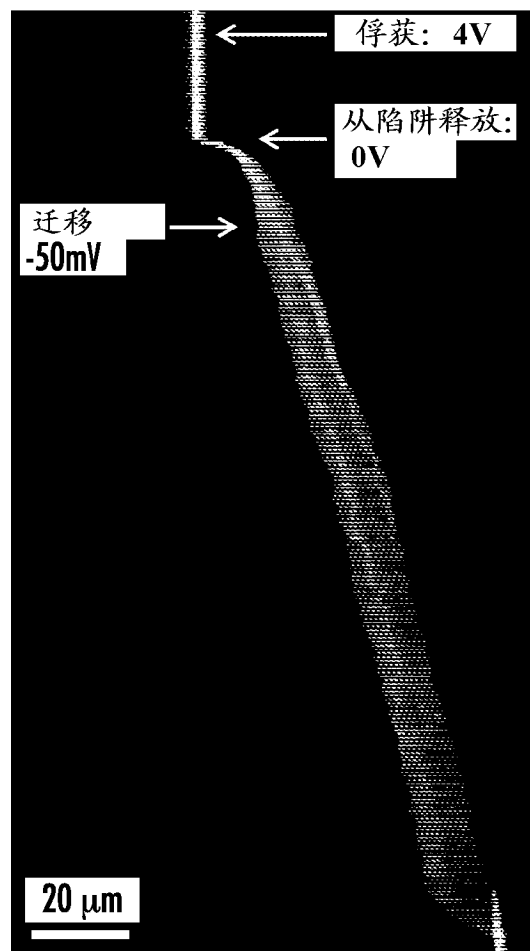


图 7

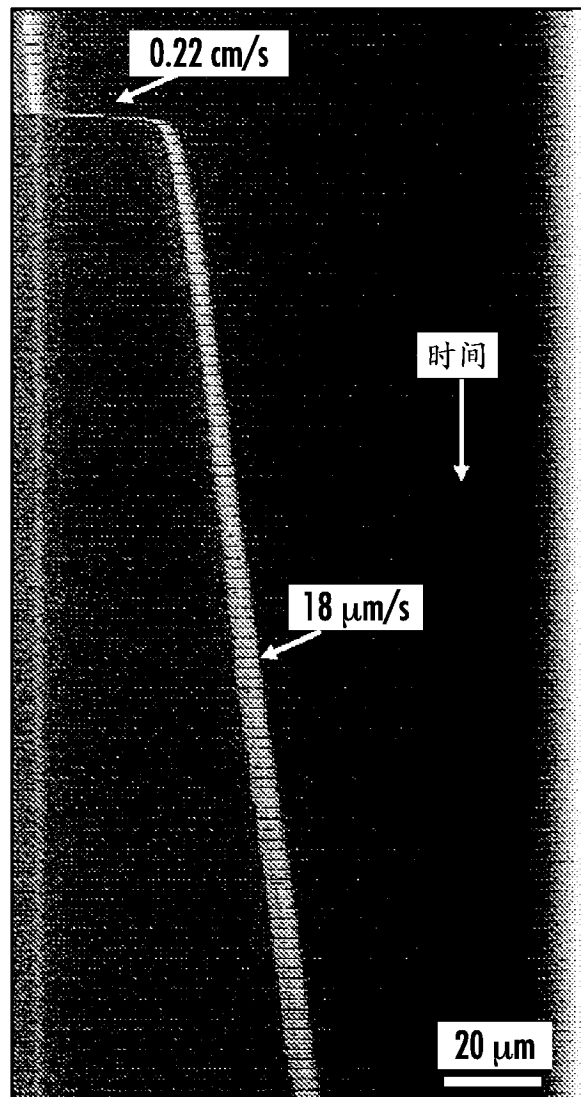


图 8

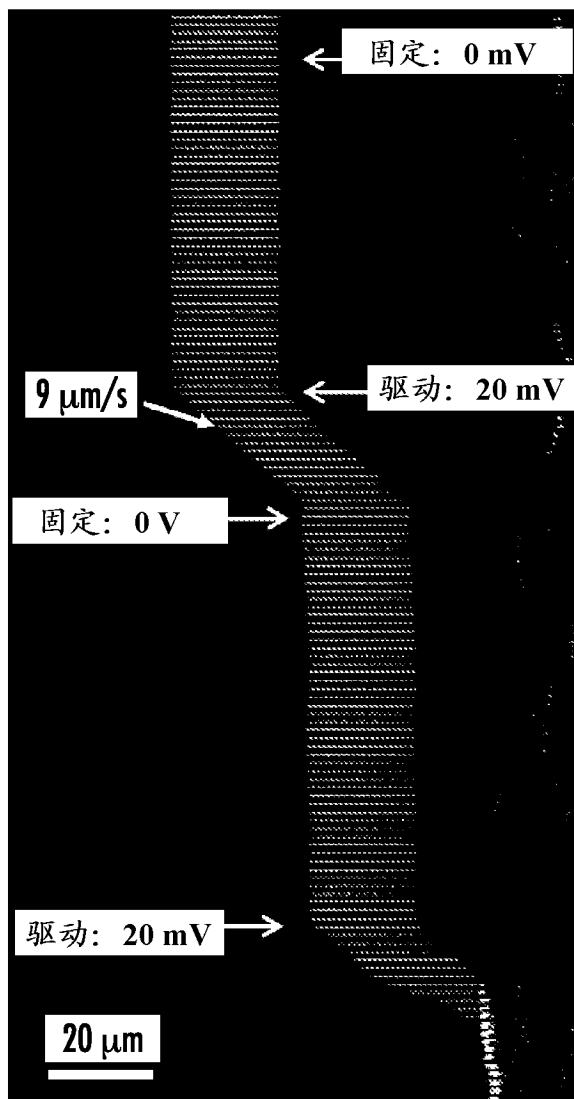


图 9A

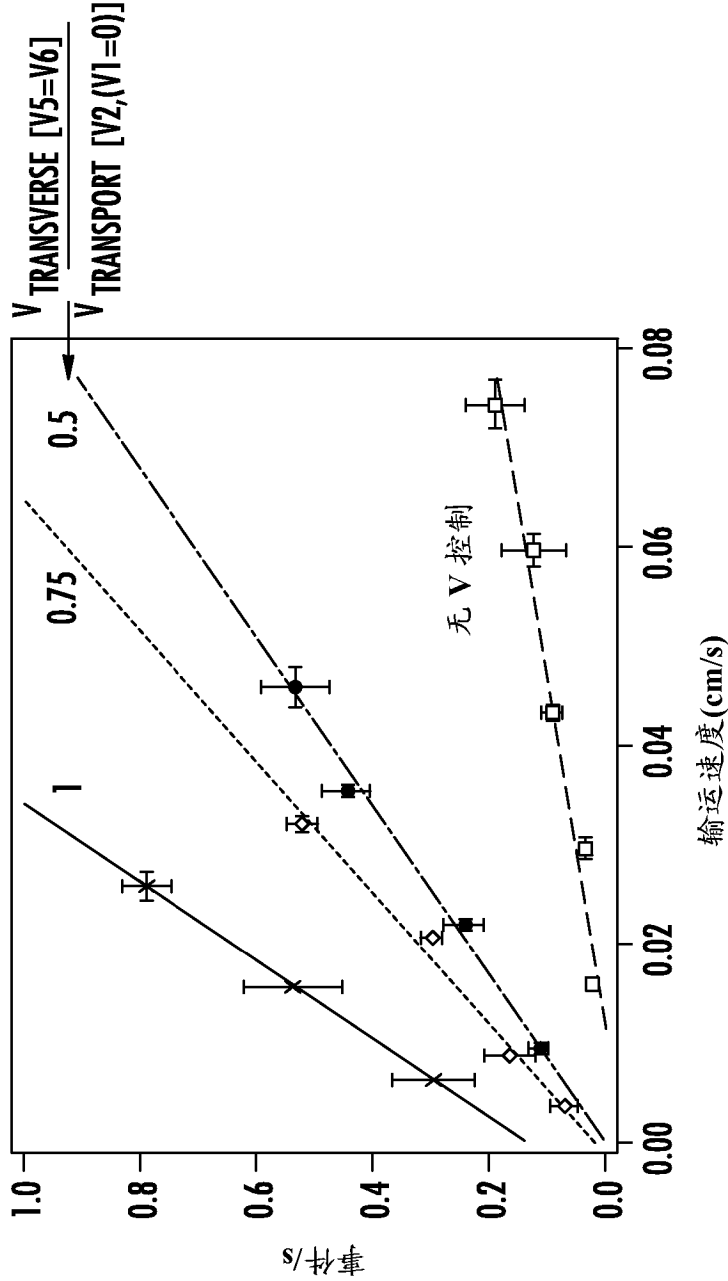


图 9B

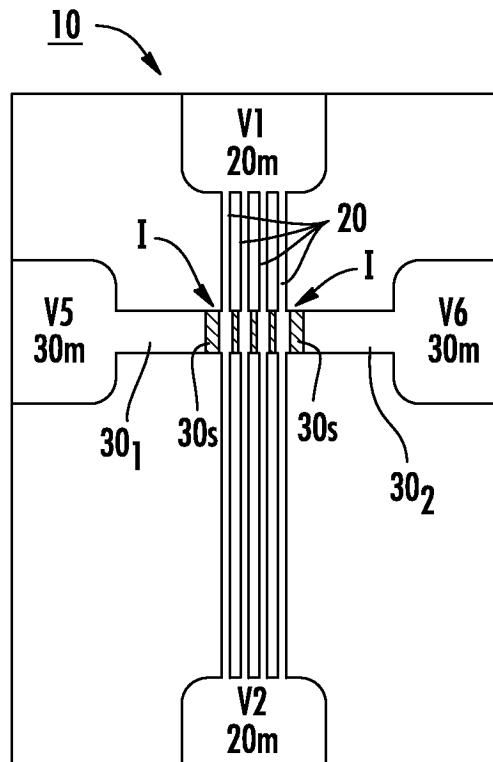


图 10A

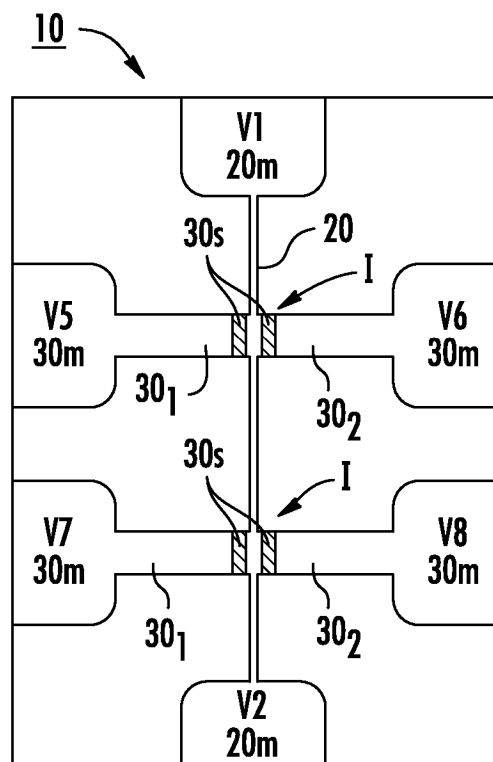


图 10B

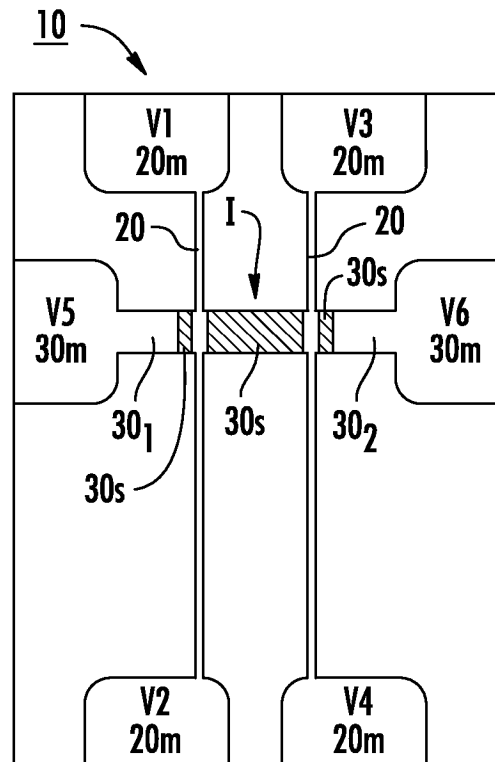


图 10C

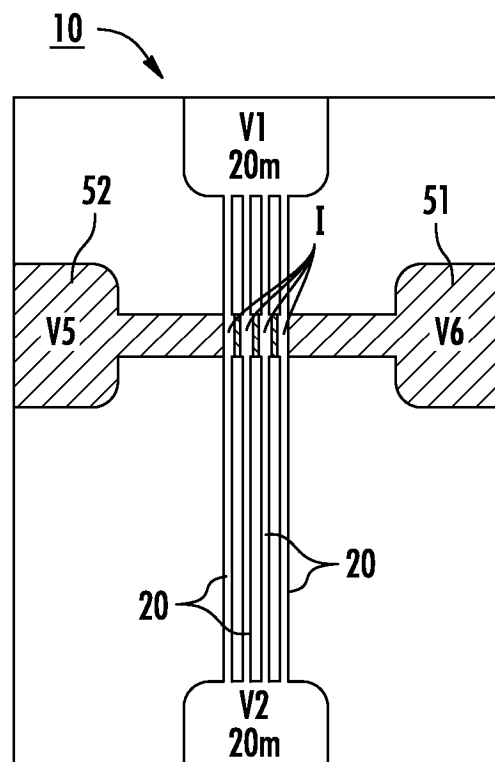


图 11A

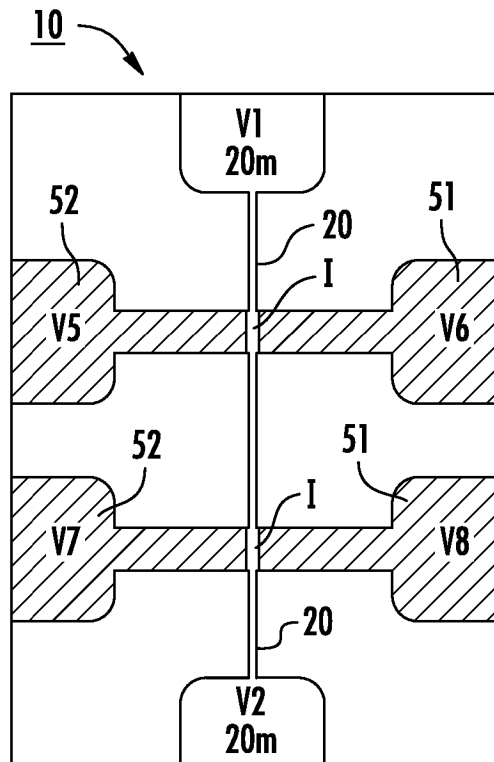


图 11B

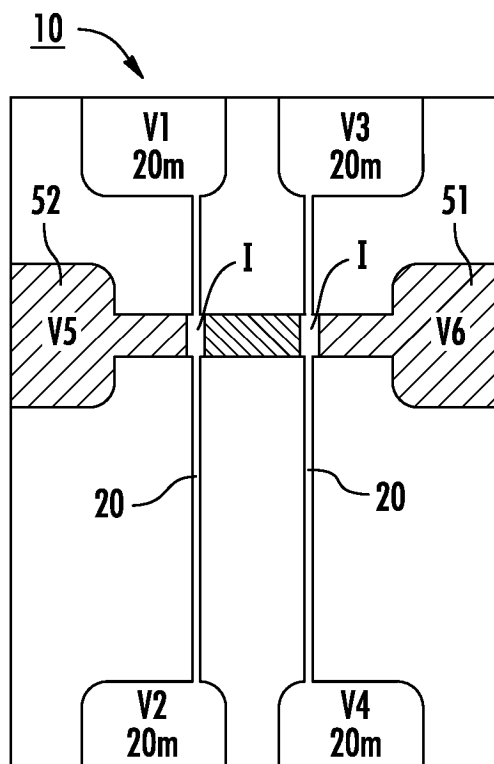


图 11C

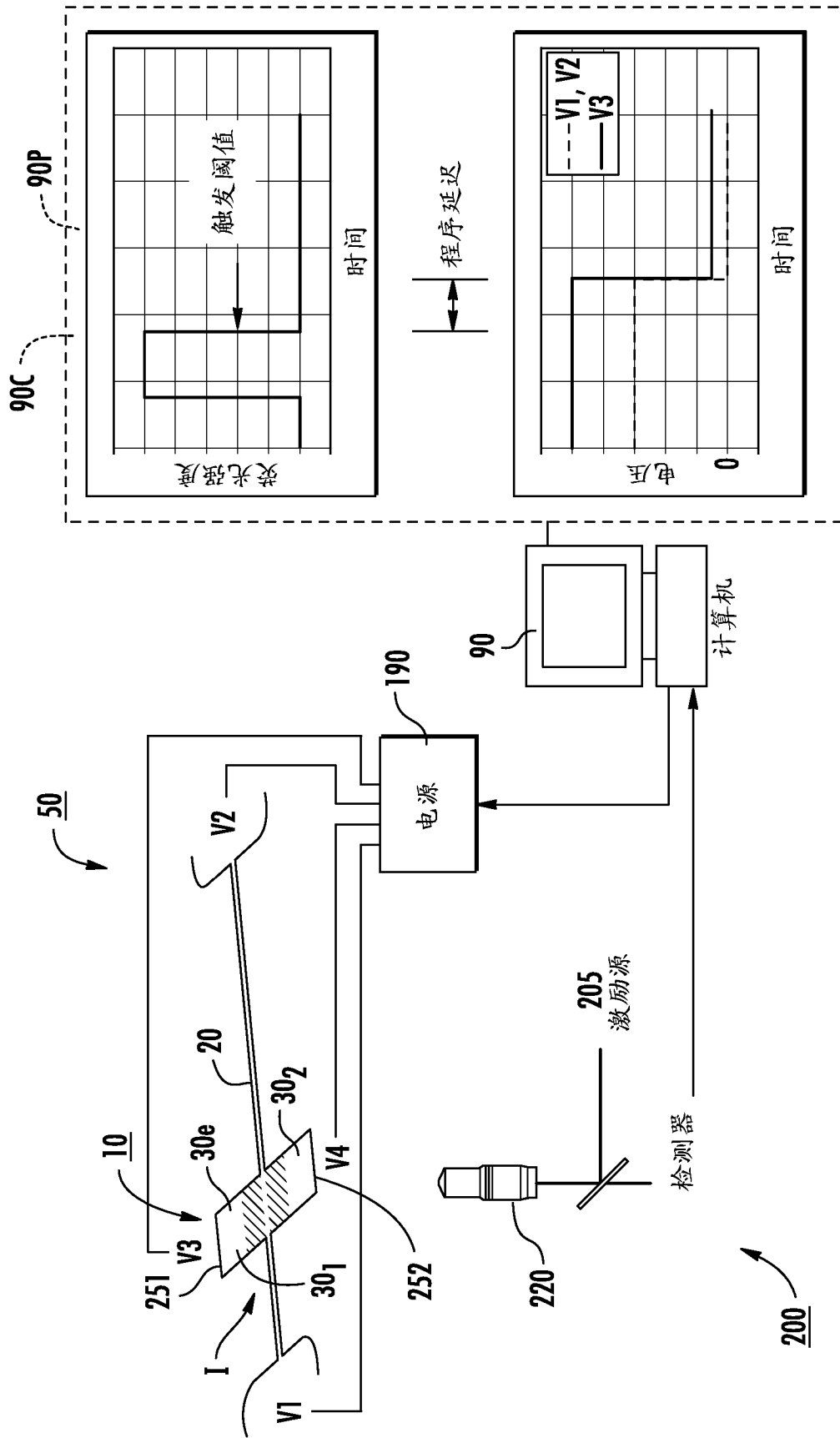


图 12

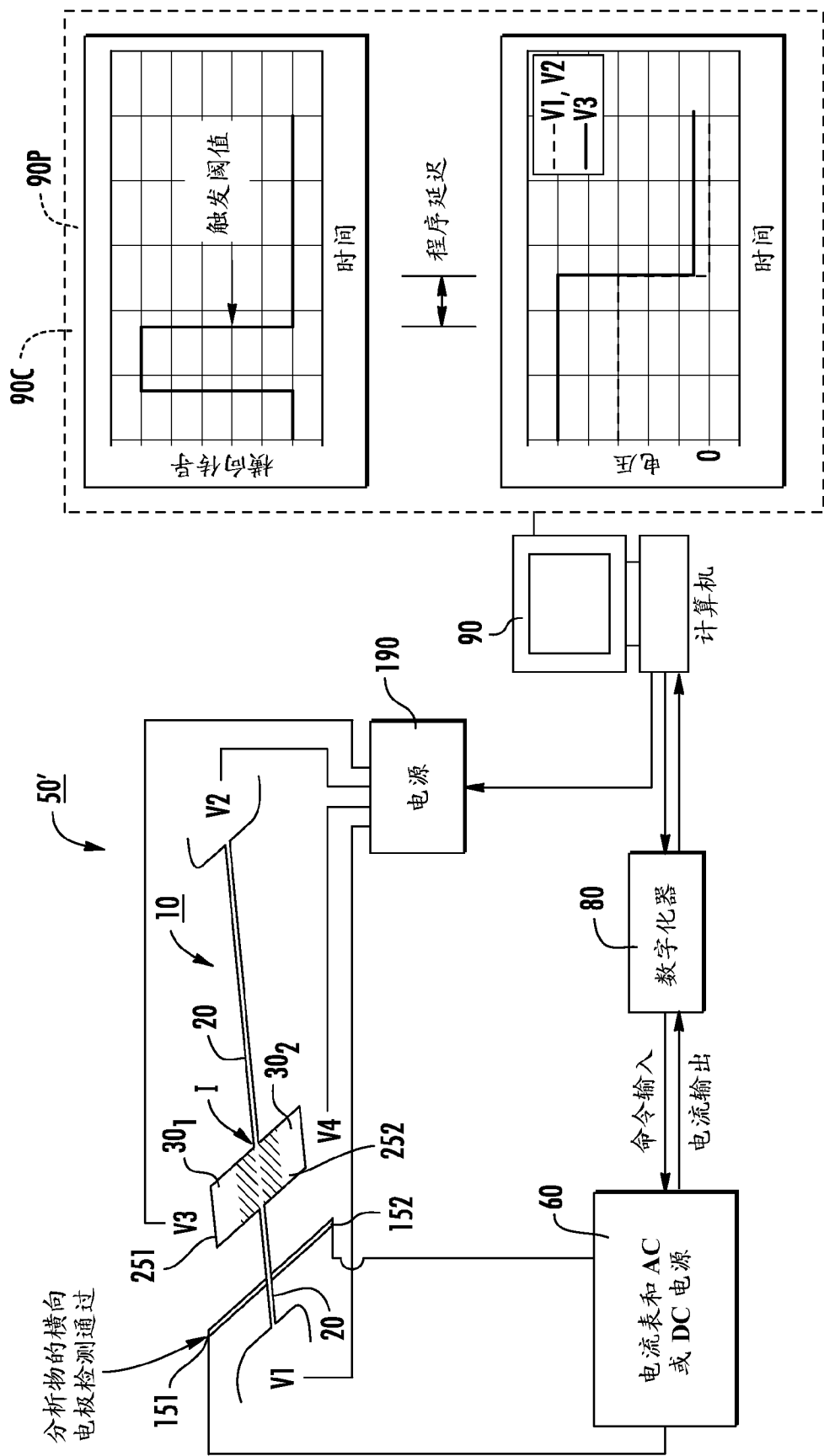


图 13