



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101971028 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200880122379. 6

(22) 申请日 2008. 09. 23

(30) 优先权数据

07380283. 7 2007. 10. 22 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/062709 2008. 09. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02009/053195 EN 2009. 04. 30

(71) 申请人 高等科研理事会

地址 西班牙马德里

申请人 航空航天大学全国学院

(72) 发明人 约翰·默滕斯

弗朗西斯科贾维尔·塔马约德米格
尔

蒙特塞拉特·卡尔加科姆兹

丹尼尔·维加莫斯

希莉亚·罗杰布兰科

乔斯安杰尔·马丁盖戈

卡洛斯·布里奥尼斯洛伦特

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 郑小粤

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 序列表 2 页
附图 7 页

(54) 发明名称

检测样品中选定类型的分子的方法和系统

(57) 摘要

本发明涉及一种基于使用微悬臂梁系统检测样品中分子和 / 或物质的方法。本方法包括改变某种条件例如湿度, 当靶分子与探测器结合时能使被分析的机械特征随特征模式发生改变。本发明还涉及用来实现此方法的系统。

1. 检测样品中选定类型的分子或物质的方法,包括以下步骤:

a) 使机械元件的受体表面与所述样品接触,当所述样品中存在所述分子或物质时所述受体表面用于与所述靶分子或物质相互作用,当所述受体表面与所述分子或物质发生相互作用时所放置的机械元件能使所述机械元件中的至少一个可检测的机械特征发生变化;

b) 检测所述机械特征以获得关于所述机械特征的数据;

c) 基于所述数据,确定样品是否含有所述类型的分子或物质;

其特征在于:

至少改变所述机械元件的至少受体表面所处的一个条件,其中多次检测所述机械特征,从而获得所述条件不同值下有关所述机械特征的数据,其中所述数据和所述条件各个值之间的关系用来确定样品是否含有所述类型的分子或物质,或确定所述受体表面和被检测的分子或物质之间的关联现象。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述条件选自:温度、相对湿度、所述机械元件所处的流体的 pH 和离子强度、所述机械元件所处的气体或液体混合物的相对含量、所述受体表面受到的辐射、电场或磁场。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述条件是湿度或相对湿度,所以改变所述机械元件的受体表面所处的湿度,由此检测不同湿度值下的所述机械特征,从而获得不同湿度水平下关于所述机械特征的数据,由此所述数据和所述湿度水平之间的关系用于确定所述样品是否含有所述类型的分子或物质。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述机械特征是部分所述机械元件的曲率。

5. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述机械特征是部分所述机械元件的位置。

6. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述机械特征是所述机械元件的至少一个振动特征。

7. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述机械特征是部分所述机械元件上的表面应力。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述机械元件是悬臂梁,所述悬臂梁的一个表面是受体表面。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中被检测的靶分子是包括 DNA、RNA 或 PNA 的核酸分子。

10. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中被检测的分子是蛋白质或肽。

11. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中被检测的物质是真核细胞、细菌、病毒或类病毒。

12. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所确定的关联现象是 DNA-DNA 杂交现象、DNA-PNA 杂交、DNA-RNA 杂交、PNA-PNA 杂交、包括多克隆或单克隆抗体的抗原-抗体相互作用、适体-配体相互作用、酶-底物相互作用、核酶-底物相互作用、蛋白质-配体相互作用、细胞-细胞粘附现象、病毒-细胞粘附现象、类病毒-细胞粘附现象或细菌-真核细胞粘附现象。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所确定的 DNA 杂交现象的特征是探针和靶之间

含有一个或多个核苷酸错配。

14. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所确定的抗原-抗体现象是抗原表位-抗体相互作用。

15. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述悬臂梁是悬臂梁芯片的一部分,其中在所述悬臂梁芯片上实施该方法以检测样品中多个不同类型的分子的存在,所述不同类型的分子与所述悬臂梁芯片中的不同悬臂梁相互作用。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中检测所述机械特征的步骤包括将一个光束直接射向所述机械元件的表面,用位置灵敏探测器 (2) 接收所述机械元件反射的光束以产生至少一个输出信号,所述输出信号是响应接收所述光束而产生的。

17. 用来检测机械结构 (5) 的形成部分的多个元件 (51) 的多点相对位移和/或振动特征的表面检测系统,所述系统包括:

- 用来产生至少一个光束 (11) 的光源 (1)

- 用来接收所述机械结构 (5) 反射的光束和产生至少一个输出信号的位置灵敏探测器 (2),其中所述输出信号是响应接收所述光束而产生的;

- 电子控制系统 (3)

- 相对所述机械结构 (5) 所述光束产生的相对位移的扫描工具 (4),以根据所述电子控制系统 (3) 的指示使用该光束扫描所述机械结构。

18. 根据权利要求 17 所述的系统,其中所述电子控制系统 (3) 用来控制所述扫描工具 (4) 以使沿着所述机械结构的光束沿第一轨道 (A) 移动,从而检测沿着所述第一轨道 (A) 的多个后续基准位置 (C),其中所述电子控制系统 (3) 与所述位置灵敏探测器 (2) 可操作地连接以确定所述基准位置 (C),作为对来自所述位置灵敏探测器 (2) 的至少一个输出信号的分析结果。

19. 根据权利要求 17 所述的系统,其中所述电子控制系统 (3) 还用来控制所述扫描工具 (4) 以使沿着所述机械结构的光束沿多个第二轨道 (B) 移动,每个所述第二轨道 (B) 与一个所述基准位置 (C) 相联系。

20. 根据权利要求 17 所述的系统,其中,在所述光束沿每个所述第二轨道 (B) 移动期间,所述电子控制系统 (3) 还用来获得多个来自所述位置灵敏探测器 (2) 的位置输出信号且其特征在于所述机械结构被置于配有改变和控制条件 (7) 的装置的小室 (6) 中。

21. 根据权利要求 17 所述的表面检测系统,其中所述小室中配有控制小室内的相对湿度条件的装置。

检测样品中选定类型的分子的方法和系统

发明领域

[0001] 本发明涉及使用微机械结构或纳米机械结构,例如微悬臂梁或纳米悬臂梁、微桥或纳米桥、微膜或纳米膜等等进行化学和 / 或生物分析和检测的领域。

背景技术

[0002] 人们对基于微机械和纳米机械元件的系统和方法的兴趣逐渐增加 [H. G. Craighead, “Nanoelectromechanical systems”, Science 290, pp. 1532-1535 (2000) and M. Li, H. X. Tang, M. L. Roukes, “Ultra-sensitive NEMS-based cantilevers for sensing, scanned probe and veryhigh-frequency applications”, Nature Nanotechnology 2, pp. 114-120 (2007)]. 微机械和纳米机械系统 (MMS) 和基于微悬臂梁的装置是这种系统的两个相关实例。

[0003] 例如, 微悬臂梁可用于超感纳米机械生物和化学传感器 [B. Ilic, D. Czaplewski, H. G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo 和 C. Batt, “Mechanical resonant immunospecificbiological detector”, Applied Physics Letters 77, pp. 450-452 (2000)]. 实时测量形状、轮廓、运动、压力和 / 或张力对于监测例如基于 MMS 或微悬臂梁或纳米悬臂梁的形状、轮廓、运动、压力或张力的化学或生物传感器的力学应答来说是十分有价值的。

[0004] MMS 和微悬臂梁系统包括基于具有固定末端和可移动末端的悬臂梁的系统;在这些系统中,通常是被检测的是“游离”末端的位移和 / 或运动。但是,也有基于在两端均加固的微悬臂梁的系统,其中可以检测中心部分的运动。此外,还有其他可移动和可变形的微机械和纳米机械结构,例如双重加固的踏板 (paddles),其“易于”移动的方向与踏板绕铰链的轴的扭转对应,其中铰链连接踏板与支架(基本上象通过球拍的两个相对的手柄固定在支架上的方形球拍,沿着一个轴延伸)。其他已知系统使用通过两副铰链连在支架上的膜,其中该支架允许两个自由角度。

[0005] 在基于 MMS 和微悬臂梁的化学 / 生物传感器中,通过选择性识别靶物质的受体或“探针”分子使微机械或纳米机械元件的表面敏化。微机械或纳米机械元件表面上的固定探针和靶物质之间的相互作用导致机械元件的形状、轮廓、张力、应力和移动(振动)发生改变。这种改变通常通过检测机械元件的代表部分(通常是一端固定的微悬臂梁的游离端,虽然也可以是两端都固定的微悬臂梁的中心、一个膜板的一部分等等)的位移来监控。这种位移可以是在大约 1-100 纳米 (nm) 范围内,并且根据应用,在很多情况下其分辨率必须大于 1nm。为了读出这些位移,出现了若干技术,例如电容检测、基于通道电流的检测、光干涉测定法、压阻式读出和光束偏转技术。

[0006] MMS 和微悬臂梁系统的实例公开于,例如:

[0007] Engel 等人,“Atomic force microscopy :a powerful tool to observe biomolecules atwork”, Trends in Cell Biology, Volume 9, pp. 77-80 (1999)

[0008] P. Vettiger 等人,“The millipede-more than one thousand tips for future

AFM storage”, IBM J. Res. Develop., Volume 44, Number 3, pp. 323-339 (2000)。

[0009] WO-A-2001/33226

[0010] WO-A-2003/091458

[0011] WO-A-2005/086172

[0012] WO-A-2007/006834。

[0013] 光束偏转方法可能是最灵敏的一种,并且其具有易实现的优点。图 1 概要介绍了一种光束偏转的常规现有技术的装置。光源(例如激光源)产生光束(例如在可见光谱、紫外光谱或红外光谱中的激光束),光束聚焦(即直接聚焦或通过包括例如一个或多个镜子等等的聚焦工具)在被检测出位移的机械元件的部分上,例如微机械装置的微悬臂梁成形部分的末端。悬臂梁反射的光束的偏转通过位置灵敏探测器(例如光电探测器,例如分区光电探测器、连续位敏光电探测器、光电探测器芯片、CCD 等等)来测量。例如,在分成两个区的地方使用分区光电探测器。悬臂梁的偏转使光电探测器上的反射激光点产生位移。因此,这两个区之间的光电流的差异与悬臂梁的偏转成正比。类似的,光束偏转技术可用于其他类型机械元件例如双重固定的悬臂梁、膜片、微踏板等等。类似的,它还可以取代面外位移显示其他类型的位移,例如微悬臂梁和微踏板的扭转移动等等。(G. Meyer 和 N. M. Amer, “Simultaneous measurement of lateral and normal forces with an optical-beam-deflection atomic force microscope”, Applied Physics Letters, vol. 57, pp. 2089-2091 (1990))。

[0014] 这种系统适合于测量机械元件例如悬臂梁的静态和动态两种行为,例如,最大偏转、偏转的平均值、基准频率的振幅(元件可由以基准频率振荡处的激发力外部驱动)、相对于外部驱动信号的移动相位、频率等等。测量到的静态位移、振幅、频率等等然后可以与被测量的且与悬臂梁相互作用的目标物相联系,并且和用来刺激该目标物和 / 或悬臂梁的信号和 / 或方法相联系。

[0015] 现在,当测量一个单独机械元件的单独一个部分的位移 / 运动时,上述技术是非常实用的。但是,这种技术不能用于基于包含多个机械元件的芯片的装置,其中每个元件的位移 / 运动都需要进行测量。这些装置具有多功能性,且比基于一个单独机械元件的装置具有更高的速度和 / 或更完整的信息。例如,基于微悬臂梁芯片的化学和生物传感器可以通过用不同受体使每个悬臂梁敏化检测多种物质 [R. McKendry R 等人, “Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, pp. 9783-9788, (2002)]。此外,获得有关微机械元件不同区域位移的信息是非常有利的,从而能够获得更多关于被检测的外界刺激或与微机械元件的不同部位相互作用的不同刺激物的信息。

[0016] 上述的专利申请 WO-A-2005/086172 公开了一种例如图 2 所显示的系统,其中一个芯片的微悬臂梁通过置于一个一维音圈激励器上的单激光光源来激发,其入射激光束以垂直于微悬臂梁纵轴的方向周期性扫描芯片。因此,微芯片上的每个微悬臂梁的游离末端被连续激发。当激光束从芯片的微悬臂梁的表面反射时,可检测到位置灵敏探测器(其用来收集悬臂梁反射的激光束)上的总光电流增加,此增加对应被检测的光电流的峰值。当检测到光电流的增加时,反射激光束打在光电探测器的对应点的位置坐标根据探测器产生的

光电流信号来确定,然后可以使用这些坐标来确定悬臂梁的偏转。

[0017] 另一方面,有时不仅需检测悬臂梁或其他种类机械元件的一个特定部位的位移,还需检测悬臂梁或类似元件或其一部分的曲率或总体形状的总体改变。因此,已知一种技术可用于微悬臂梁传感器,其利用具有双层结构(例如在硅或氮化硅上的一层薄金膜)的悬臂梁的弯曲。由于分子吸收导致的任何温度变化或表面压力的差异都使悬臂梁的曲率发生变化。为了获得曲率半径的变化,已知一种基于使用八个聚焦在金包被的硅悬臂梁的不同位置上的发光二极管的检测系统。悬臂梁上的每个点的偏转通过使用光束偏转技术的位置灵敏探测器测量至亚纳米级精度,从而获得悬臂梁的曲率。此方法公开于 Sangmin Jeon 等人,“Instant curvature measurement for microcantilever sensors”, *Applied Physics Letters*, vol. 85, no. 6, pp. 1083-1084 (2004)。

[0018] 除了测量悬臂梁特定部位移位或测量悬臂梁曲率的悬臂梁系统,还可能有机机械结构例如膜片对不同刺激在不同区域被敏化,以此方法来获得每种刺激的信息对于检测机械结构的每个被敏化区域的移位是必须的。

[0019] 上述 WO-A-2007/006834 公开了一种如图 3 显示的系统。此系统用于检测位于机械结构的多个元件形成部位的多个点的相对移位和 / 或振动特性,且包含一个用来产生至少一个光束的光源、一个用来接收从机械结构反射的光束和产生至少一个响应所述光束接收的输出信号的位置灵敏探测器、一个电子控制系统和用于所述光束相对该机械结构发生的相对位移的扫描工具从而根据电子控制系统的指示使用该光束扫描所述机械结构。此电子控制系统用来控制扫描工具以使沿着机械结构的光束沿第一轨道 (A) 移动,从而检测沿着所述第一轨道 (A) 的多个后续基准位置 (C),其中所述电子控制系统与所述位置灵敏探测器有效相连,从而确定所述基准位置 C,作为来自所述位置灵敏探测器的至少一个输出信号的分析结果。此外,此电子控制系统用来控制扫描工具以使沿着机械结构的光束沿多个第二轨道 (B) 移动,每个所述第二轨道 (B) 与一个所述基准位置 (C) 相连。此电子控制系统还用来在光束沿着每个所述第二轨道 (B) 移动期间从所述位置灵敏探测器获得多个位置输出信号。

[0020] 使用这一系统可获得机械结构的多个选定位置或该结构的一个目的区域的位移和运动的实时测量。这为机械结构如何根据测量的物体而变化提供了更多信息,从而可以获得更高的灵敏度和更高的信噪比。例如,在一些微悬臂梁传感器中,沿着微悬臂梁的曲率与微悬臂梁表面吸收的分子有关。为了获得其曲率,必须测量沿着微悬臂梁的多个位置的位移。

[0021] 在化学传感器或生物传感器中,用于检测的机械元件(例如纳米悬臂梁或微悬臂梁)具有如前文所述的一个部分,用来与被检测的一种(或多种)分子相互作用,以使与所述部分接触的样品中所述分子的存在导致了其机械性质的变化,例如曲率、表面压力和 / 或振动特性的改变,这种改变可以用例如前文描述的方法来检测。

[0022] 例如,悬臂梁的一个主要表面可通过作为受体或“探针”的物质或分子层获得功能。这种功能可通过物质或分子与悬臂梁表面的化学或物理相互作用来实现。例如,可使用一种交联分子,其中该分子的一个末端与悬臂梁表面形成共价键,而另一末端与探针分子具有很强的亲合力。大多数广泛使用的方法是基于悬臂梁表面的硅烷化,以及悬臂梁表面的探针分子的自组装单分子层的固定。可选择受体或探针来研究其与其它靶物质或分子

的相互作用,最终确定被分析的样品中靶物质的浓度。在此申请中,受体特异性与靶结合,且此特异性相互作用通常称为为分子识别。受体或探针分子的实例包括核酸(DNA、RNA、PNA 或其它)、蛋白(抗体、酶或其它)、其它生物聚合物等等。靶分子或物质可稀释于气体样品或液体样品中。生物学靶通常以水溶液形式存在 [Briones, C. 和 Martin-Gago, J. A., “Nucleic acids and their analogs as nanomaterials for biosensor development”, *Current Nanoscience* 2, 257-273 (2006)]。

[0023] 例如,一个机械元件可具有至少一个受体表面(例如其中一个侧面已经被分子受体例如DNA、受体等等功能化的悬臂梁)用来(例如该悬臂梁在一个具有进水和出水通道的微流控小室中浸入缓冲液以注入含有靶分子的缓冲液)和与所述受体表面接触的样品中至少一种存在的分子中相互作用。使用此机械元件,当所述受体表面与所述靶分子相互作用时,所述元件的至少一个可检测的机械特征(例如部分元件的曲率、部分元件表面的位置、和/或振动特性)发生改变,随后进行测量以确定所述机械特征是否发生改变以及改变的程度。如果已经发生改变(至一定程度),即可推断该样品中含有此类可与固定的探针分子特异性相互作用的分子。有时,随时间变化监测机械特征的改变,也就是使该元件与该样品接触且检测该机械特征(例如悬臂梁的曲率),如果发生改变则及时检测到。如果检测到其改变,则推断该样品中存在该靶分子。

[0024] 然而,到目前未知,所开发的技术都具有一些问题:

[0025] - 有时,被检测到的“变化”是由其它因素产生的而不是来自于受体表面和靶分子的相互作用。例如,靶和机械元件的非特异性相互作用、温度的细微变化、液体溶液中离子的微小变动、流体湍动、折射系数改变、检测机械元件移动的光学元件的位置随时间的缓慢变化等等都可产生变化。

[0026] - 此外,为了检测到变化,必须实时监测机械元件,也就是说,基本上从它开始与样品接触那一刻起,变化必须在其发生时马上检测(因为改变前和改变后关于该特征的数据都必须获得)。

[0027] - 此外,变化(例如曲率的改变)的幅度可能是相当小的,这显然使得检测更加困难。

[0028] 定义:

[0029] 抗体。B细胞表面的一种Y形蛋白质(免疫球蛋白),它是分泌至血液或淋巴液中以应答抗原刺激,例如细菌、病毒、寄生虫、或移植器官,并且其通过与抗原特异性结合来中和抗原。抗原-抗体对的形成的检测可通过多种方法来实现,这是许多生物传感器的基础。

[0030] 抗原。一种刺激抗体生成或动员抗体的物质。抗原可以是外源蛋白质、毒素、细菌或其它物质。

[0031] 适体。一种体外设计来与配体分子特异性相互作用的核酸分子。适体-配体对的特异性可以与抗原-抗体对的特异性一样高。适体-配体对的形成可通过多种方法实现。

[0032] 生物传感器。包含一个生物识别元件(例如酶、受体、DNA、抗体或微生物)的分析装置,该识别元件与电化学、光学、热学或声频信号转换器直接相连,共同分析化学性质或数量。在某些领域包括环境监测方面具有潜在发展。

[0033] 生物芯片。结合在固体表面(玻璃、硅等等)上的单链DNA分子的一种高密度阵列,同一时间内快速识别(杂交)数以千计的基因,同时进行数以千计的基因的高通量分

析。

[0034] 悬臂梁。一种机械结构,例如一个横梁,在一个末端有支撑:该末端的偏转与负荷或外部作用力成正比。使用硅技术微制造悬臂梁广泛用作传感器。

[0035] DNA。一种由四个含氮碱基-腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和鸟嘌呤组成、通过磷酸和戊糖脱氧核糖插入单位相连的有机酸和聚合物。DNA是大多数有机体的遗传物质,通常以双链分子存在,其中两条逆平行链通过腺嘌呤-胸腺嘧啶和胞嘧啶-鸟嘌呤之间的氢键结合。

[0036] 杂交。DNA的两条互补链之间或DNA和RNA各一条以氢键结合形成一个双链分子的过程。

[0037] 分子识别。生物分子与另一个具有互补形状分子特异性结合的能力。分子识别推动所有生物学例如激素和受体或抗原-抗体相互作用,或使分子组装成更大的生物学活性实体。

[0038] MEMS。微电子机械系统。通常用来涉及微米级别的连接机械和电子组件的系统,并且是使用半导体制造技术制造的。MEMS对刺激产生响应或产生物理力(传感器和激励器)。微型加速度计是此领域最成功的产品,用于在汽车中触发气囊。当此系统生产为纳米级时,可将其定义为NEMS。

[0039] 错配(或错误配对)。其发生于双链核酸的至少一个位置上,两条链具有两个不能杂交的非互补核苷酸。

[0040] 突变。还已知为“单核苷酸多态性”(SNP),它是指相对于另一条参考序列,核酸的核苷酸序列的改变。这种改变可以是一个核苷酸被另一个核苷酸置换、一个或多个核苷酸的插入或缺失。

[0041] NEMS。参见MEMS。

[0042] 寡核苷酸。一条长度在3-250nt之间的单链核酸分子,它可以与一条互补的核酸序列杂交。

[0043] 肽核酸(PNA)。一种人造核酸分子,其中磷酸-糖骨架被拟肽结构取代。PNA的每个单体由一个N-(2-氨基)甘氨酸分子通过亚甲基羰基单位连接至A、G、C和T组成的组中的一个核酸碱基组成。PNA显示了独特的物理化学性质,它不带电、无手性,并且是具有高生物学和化学稳定性的相对坚硬的聚合物。

[0044] 探针。它是指由特定核苷酸序列组成的一定长度的寡核苷酸,可以在一定条件下与互补靶序列全部或部分杂交。在本发明的上下文中,寡核苷酸探针被固定在微机械或纳米机械结构上,且在特定环境下可在其上形成自组装的单分子层。

[0045] 蛋白质。由一条或多条多肽链组成的分子,其中每条多肽链由氨基酸直链通过肽键共价连接形成直链。

[0046] 共振。振动系统的最大振幅响应交替驱动力的情况。当驱动力频率与该系统的天然无阻尼振动频率相同时会出现这种情况。

[0047] 自组装单分子层(SAM)。一个二维膜,一个分子的厚度,在一个介面上共价组装。典型的试剂是使用巯基与金或三氯硅烷与SiOH基团的反应。

[0048] 敏化。参见表面功能化和自组装单分子层。

[0049] 表面功能化。在一个表面引入化学功能基团的方法或技术。在生物传感器中使用以在传感器上固定生物分子受体。

[0050] 张力。是指物体受到压力作用导致的变形的几何表达。

[0051] 应力。是指物体内的每单位面积上的受到的力的度量。

[0052] 表面应力。总自由表面能除以表面积的函数 (strain derivative)。

[0053] 靶序列。被分析样品中存在的核酸分子或序列,其易与固定的寡核苷酸探针杂交。

[0054] 发明详述

[0055] 本发明的第一个目的是检测样品中所选类型的分子或物质的方法,包含以下步骤:

[0056] a) 使机械元件的受体表面与样品接触,当所述样品中存在所述分子或物质时,所述受体表面与所述分子或物质发生相互作用,当所述受体表面与所述分子或物质发生相互作用时,被放置的所述机械元件使所述元件的至少一个可检测的机械特征发生改变;

[0057] b) 检测所述机械特征以获得关于所述机械特征的数据;

[0058] c) 根据所述数据,确定样品是否含有所述类型的分子或物质;

[0059] 其特征在于改变所述机械元件的至少受体表面所处的至少一个条件,其中对所述机械特征进行多次检测,从而获得不同所述条件值下关于所述机械特征的数据,其中所述数据和该条件的所述值之间的关系用来确定样品是否含有所述类型的分子或物质,或用来确定该受体表面和被检测的分子或物质之间的关联现象。

[0060] 因此,代替仅仅是检测机械特征的“绝对”值(为了检测例如曲率的“绝对”变化),该“绝对”值可能很小或被该机械元件也敏感的其它外界参数变化或测量仪器校准改变所掩盖,通过本发明的方法,在不同条件下检测该机械特征。因此,在这些条件下该机械特征改变的方式可用来确定该样品中是否存在相关靶分子或物质。

[0061] 这可能是由于被检测的分子或物质和该机械元件本身之间和/或所述分子和与受体表面连接的探针分子之间的相互作用可根据受体表面所处的条件不同而不同。然后,该分子和该受体的结合改变了对于该条件的该机械特征。能够进行改变的条件的实例是温度、相对湿度、机械元件所处的流体或溶剂的 pH 和离子强度、悬臂梁所处的气体或液体混合物的相对含量(例如在水-水合和乙醇-脱水的混合物中可得到类似的湿度效果)、受体表面受到的辐射、电场、磁场等等。

[0062] 这种检测样品中分子的存在的方法是十分有利的,因为它提高了灵敏度(它不再仅仅依赖于当分子偶联至受体时诱导的变化的绝对“强度”)且不需比较传感器元件接触样品前后的相关机械特征即可检测其存在。将机械元件与样品接触后,它足以进行检测,因为其检测的是当条件变化时所述机械特征改变的方式,而不是机械元件与样品接触后其改变的方式。

[0063] 因此,在本发明中,不用检测机械特征随时间的变化,检测的是不同条件值下机械特征的改变,例如不同温度、相对湿度的不同水平等等。

[0064] 也就是说,被检测的分子和受体表面之间的“相互作用”不再需要实时“检测”。取而代之,使用根据本发明的方法,机械元件(例如形成微悬臂梁芯片部分的微悬臂梁)可以与样品接触,随后通过本发明的方法来分析。基于与当条件(例如相对湿度)改变时元件的相关机械特征(例如其曲率)的行为有关的现有知识,受体表面和被检测分子之间有或没有相互作用,都可以确定所述分子是否存在(即与受体相互作用,基本上是与其偶联)。因此,当条件改变时机械特征的“行为”不同,这取决于被检测的分子是否存在,预示了所谓

所述分子的“指纹”，从而使得使用本发明的方法可确定其存在。

[0065] 除了以高灵敏度检测一个特定靶分子或物质外，此方法检测靶 DNA 的极限在 1fM 以下，本发明的方法可以确定被检测分子和受体之间发生的不同现象，即与分子（受体和靶）之间相连或彼此结合的方式有关的现象。

[0066] 对此可通过参考一个特殊例子非常容易地进行解释，例如，用此方法检测样品中的 DNA 分子。在此例子中，受体表面用与样品中被检测的分子（完整分子或其序列中的特定部分）互补的探针核酸（通常是 DNA）分子来功能化。当探针和靶之间具有 100% 序列互补性时，悬臂梁表面将进行完整的杂交。然后，正如前述所解释的，此方法显示了特定条件下的改变（例如湿度）以获得所述条件（例如相对湿度）变化值下该分子的“指纹”。但是，如果没有 100% 互补性，而是例如靶分子中的一个单个核苷酸不同（或在不同错配位置上甚至有两个或更多个核苷酸），尽管“指纹”会因为靶 - 探针对的不同行为而不同，杂交仍可发生（取决于实验条件）。这种用途在分子生物学和基因组学领域十分重要，因为它可以简单和有效的方式分析一个或多个特定基因中存在的突变或 SNPs（单核苷酸多态性）。

[0067] 本发明的这种特殊用途可被认为是更明确和重要的实例，虽然本方法可用于确定分子之间的其它相关现象，包括例如抗原 - 抗体或适体 - 配体的相互作用，以及细胞之间、细胞 - 表面、病毒 - 细胞之间的粘附现象等等。

[0068] 当用于核酸检测时由于本发明的方法达到了高灵敏度（飞摩尔级灵敏度），乙醇可能可以避免之前对样品的扩增。样品的标记也可避免。因此，本发明的方法无需高花费、费时和样品的复杂处理即可直接应用于生物工程。

[0069] 在本发明的一个优选实施方案中，被改变的条件是相对湿度 (RH)。当机械元件的受体表面的 RH 改变时，检测不同 RH 值下的所述机械特征，从而获得不同湿度水平下有关所述机械特征的数据，并且所述数据和所述湿度水平间的关系用来确定样品是否含有所述类型的分子或物质，和在是核酸分子的情况下，与固定的探针的全部或部分互补性。

[0070] 在本申请中已发现相对湿度是十分有用的参数，因为相对湿度的改变可以实质性影响结合到表面上的许多类型分子之间的相互作用。相对湿度的改变能调节该分子周围的水分子的数量。生物分子的水合方式在其生物功能和结构中起重要作用。此外，分子的水合改变了它们之间的相互作用，例如：水合力、偶极 - 偶极力、静电力、范德华力、溶剂化力等等。

[0071] 因此，当相对湿度改变时，与受体相连的分子层的机械性质发生改变，从而诱导机械元件的机械特征发生变化。例如，改变湿度，由于与机械元件上分布的受体相连的分子之间偶联的变化，会使悬臂梁的曲率发生改变。

[0072] 在本发明的方法中，样品中存在靶分子或受体和被检测的分子之间存在特定关联现象的推断来自于本发明上下文中所谓机械特征的检测。这个术语是指当分子和受体表面的结合诱导其机械性质的某些变化时生物传感器的机械元件中检测的某一特征。被检测的机械特征可以选自一部分机械元件的位置或机械元件的至少一个振动特性或优选一部分机械元件上的表面应力。

[0073] 在本发明的一个优选实施方案中，检测机械特征的步骤包含将光束直射向所述机械元件的表面，用位置灵敏探测器（图 8 中的 2）接收所述机械元件反射的光束来产生至少一个响应所述光束产生的输出信号。虽然如此，正如技术人员所容易理解的，任何适用于检

测机械特征的其它方法显然是在本发明的范围内的。

[0074] 一般来说,本发明的方法用于检测几乎任何种类的物质,因为每种物质都具有经典“指纹”,然而此方法尤其用于生物学领域中以及用于生物工程和生物医学中。在被检测的不同分子中,DNA、RNA、蛋白质和肽是特别优选的靶分子,因为当实验条件例如相对湿度改变时它们显示了非常大的波动的行为。本方法还适用于分析和确定此类分子之间的关联现象,例如核酸杂交现象或抗原-抗体结合现象。在DNA或RNA杂交现象的例子中,可分析和确证探针和靶之间一个或多个核苷酸的错配。因此,本方法是以一种方便有效的方式分析和确证单核苷酸多态性(SNPs)的有利工具。至于抗原-抗体结合现象,易于分析抗原表位-抗体的相互作用。

[0075] 另一方面,本发明还适用于检测更复杂的物质例如细菌、病毒、真核细胞原生动动物等等。还可分析和确证的关联现象例如细胞-细胞粘附现象或病毒-细胞或细菌-细胞粘附。

[0076] 在本发明的一个优选实施方案中,机械元件是悬臂梁且所述悬臂梁是悬臂梁芯片的一部分,其中在所述悬臂梁芯片上实施本方法以检测样品中多种不同类型分子的存在,所述不同类型分子与所述悬臂梁芯片的不同悬臂梁相互作用。

[0077] 本发明的第二个目的在图8中简要表示,它表示了一种实施本发明方法的系统。这是一种表面检测系统,用来检测机械结构(5)的形成部分的多个元件(51)的多个点相对位移和/或振动特性,所述系统包含:

[0078] 用来产生至少一个光束(11)的光源(1);

[0079] 用来接收机械结构(5)所反射的光束和产生至少一个响应所述光束接收的输出信号的位置灵敏探测器(2);

[0080] 电子控制系统(3);

[0081] 所述光束相对机械结构(5)的相对移位的扫描工具(4)以根据电子控制系统(3)的指示用光束扫描所述机械结构;

[0082] 其中所述电子控制系统(3)用来控制扫描工具(4)以使沿着机械结构的光束沿第一轨道(图8B中的标记A)移动,从而检测沿所述第一轨道(A)的多个后续基准位置(C),其中所述电子控制系统(3)与所述位置灵敏探测器(2)可操作地连接以确定所述基准位置(C)作为来自所述位置灵敏探测器(2)的至少一个输出信号的分析结果;

[0083] 其中所述电子控制系统(3)还可用来控制扫描工具(4)以使沿着机械机构的光束沿多个所述第二轨道(B)移动,每个所述第二轨道与一个所述基准位置(C)相联系;

[0084] 所述电子控制系统还可在光束沿每个所述二级轨道(B)移动期间用来获得多个来自所述位置灵敏探测器(2)的位置输出信号,并且其特征在于机械结构放置在小室(6)中,其中该小室具有可改变和控制条件的装置(7)。

[0085] 这一系统对于实现本发明的方法是有用的。在本发明的一个优选实施方案中,此系统包扩改变或控制小室内相对湿度的装置,尽管控制其它条件例如温度、机械元件所处的流体的pH和离子强度、悬臂梁所处的气体或液体混合物的相对含量、受体表面受到的辐射、电场、磁场等等的装置也是本发明的一部分。

附图说明

[0086] 为了完善本说明书和提供对于本发明更好的理解,提供了一组附图。所述附图是本说明书的一部分且说明了本发明的一个优选实施方案,这不应解释为限制本发明的范围,而仅是作为本发明如何具体实施的一个实施例。包括下列附图:

[0087] 图 1、2、3A 和 3B 是使用光束偏转技术识别悬臂梁的不同现有技术系统的简图。

[0088] 图 4 显示了本发明的优选实施方案的实验装置。

[0089] 图 5 显示了与使用 dsDNA(完整互补的探针-靶杂交后)的悬臂梁进行相同水合-脱水循环时的大大降低的滞后相比,当进行水合-脱水循环时 ssDNA 感化的悬臂梁的高滞后。

[0090] 图 6 左:在不同时间和靶浓度 1pM 下的 dsDNA 水合循环期间表面应力的变化。右:完整互补的 DNA 靶不同浓度(从 1fM 至 1000fM)下当 RH = 5% 时表面应力随时间的变化。

[0091] 图 7 显示了在三个不同的错配 DNA 靶序列水合期间悬臂梁表面的表面应力的变化。

[0092] 图 8 显示了一个根据本发明的表面检测系统。A 代表整个系统装置和 B 代表机械元件。

[0093] 本发明的一个优选实施方案的详述:

[0094] DNA 生物传感器

[0095] DNA 芯片是后基因组时代中最重要的生物技术工具之一。它们实现了许多核酸分子的平行、高通量检测和定量测定,虽然这些芯片需要对靶样品进行扩增和荧光标记的多个预杂交步骤并且灵敏度有限,其中这些步骤昂贵费时。此外,靶 DNA 的标记可能影响其分子识别能力,同时分析样品中可检测的靶分子的相对组成可发生偏移 [Levicky, R., Horgan, A. "Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies". Trends Biochem. 23, 143(2005)]。

[0096] 换句话说,我们的研究已经显示使用具有可调相对湿度的系统,通过检测微悬臂梁表面连接的核酸之间的分子间相互作用产生的表面应力,不需标记物或预扩增步骤即可快速和灵敏地检测核酸杂交。

[0097] 本发明的方法显示不需靶 DNA 的标记物或预扩增,通过检测与靶分子杂交前后微悬臂梁表面连接的核酸探针之间的分子间相互作用的水合作用即可快速和灵敏地检测核酸杂交。此技术提供了几微升取样体积的亚飞摩尔级的灵敏度,确保了比生物工程和生物医学装置中使用的当前标准 DNA 芯片至少高三个数量级的灵敏度。此外, DNA 生物层在水合中发展的分子间力的纳米机械转录物可以在室温下分辨完整配对和单核苷酸错配的 dsDNA。

[0098] I- 技术详述

[0099] 图 4 和图 8 显示了实验装置。作为提高纳米机械 DNA 传感器灵敏度的另一种方式,当监测表面应力如何变化时选择外部调整悬臂梁上连接的相邻 DNA 分子之间的相互作用。单链 DNA 探针通过巯基连接臂固定在微悬臂梁金包被的一面上。在本发明的一个特殊应用中,使用的 16nt ssDNA 探针的序列为 5' -HS-CTACCTTTTTTTCTG-3'。在长时间固定(12-24 小时)后, ssDNA 形成了一个表面密度为 10^{13}cm^{-2} 数量级的高堆积层,这是通过 X 射线光电子能谱(XPS)实验确定的。这些密度对应 DNA 之间的距离低于 0.3nm。在这个分隔范围,分子间力由围绕 DNA 分子的氢键网络干扰产生的水合斥力占主

导。水合力以 0.25-0.35nm 的特征距离指数增加。一级水化膜由每对核苷酸有 30 个水分子形成,且这种水层是液体水和冰之间的过渡态 [M. Rovere & P. Gallo, "Effects of confinement on static and dynamical properties of water", Eur. Phys. J. E. 12, 77-81 (2003) 和 N. Floquet, J. P. Coulomb, N. Dufau, G. Andre, & R. Kahn, "Structural and dynamic properties of confined water in nanometric porous materials", Physica B 350, 265-269 (2004)]。这种一级水化膜在生物化学功能和分子间相互作用中起关键作用。基于已知知识,开发了一种新方法加深表面结合的 DNA 的水合的物理化学特性同时提高基于微悬臂梁生物传感器的灵敏度。已证明可通过先将 DNA 包被的微悬臂梁置于干燥氮气中,然后通过调整输入氮气的相对湿度控制水合程度来外部调整水合力。根据本发明的表面检测系统使用的此方法可以每个核苷酸一个水分子的空前的灵敏度观察到水合诱导的表面应力的变化。

[0100] 芯片中实验的顺序是:

[0101] i) 通过从 0 至 100% 以及而后反向改变 RH (相对湿度) 检测 ssDNA 功能化的悬臂梁水合 / 脱水诱导的表面应力;

[0102] ii) 将功能化的悬臂梁与核酸样品溶液接触,其中核酸样品中包含:a) 完全互补的靶 ssDNA 分子;b) 一个具有(一至三个)错配的 ssDNA 靶;c) 一个非互补 ssDNA (阴性对照);然后冲洗和干燥悬臂梁和

[0103] iii) 当系统进行二次水合 / 脱水循环时检测表面应力。

[0104] 在本发明的一个特殊实施方案中,完全互补的 ssDNA 分子具有序列 5' -CAGAAAAAAAAAGGTAG-3', 而错配序列为:1) 接近双链的中心位置的靶 "T" 具有一个单独 T/T 错配 (序列 5' -CAGAAAATAAAGGTAG-3');2) 中心位置的靶 "TTT" 具有三个连续 T/T 错配 (序列 5' -CAGAAATTTAAGGTAG-3');3) 被三个碱基对分开的靶 "T...T...C" 具有三个单独的错配 T/T、T/T 和 C/C (序列 5' -CAGTAAATAAACGTAG-3')。这些序列的理论杂交温度分别是 $34 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 $11 \pm 4^\circ\text{C}$, 而完全互补的靶序列杂交温度是 $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 。非互补 ssDNA (阴性对照) 序列为 5' -AGCTTCCGTACTIONCGAT-3'。

[0105] II- 固定和杂交

[0106] ssDNA 敏化的悬臂梁对水合 / 脱水循环的响应显示了高滞后,而对于进行了完全互补杂交的悬臂梁来说,滞后大大降低 (参见图 5)。已知完全杂交 DNA 层具有不能渗透的性质,这是因为层上稠密堆积的分子导致的空间位阻,而 ssDNA 层易被水分子插入生物多聚物内部,这解释了当该层水合时观察到的高拉伸应力 [J. Mao, S. Chang, S. Yang, Q. Ouyang & L. Jian, "Tunable non-equilibrium gating of flexible DNA nanochannels in response to transport flux", Nature Nanotechnology 2, 366-371 (2007) 和 B. Schneider & H. M. Berman, "Hydration of the DNA bases is local", Biophys. J. 69, 2661-2669 (1995)]。对于敏化的悬臂梁 (ssDNA), 表面应力在高达 5% 的相对湿度下初期水合期间有急剧上升 (拉伸)。然后表面应力降低直至 $\text{RH} > 60\%$ 相对与水合无关。

[0107] 当浸入互补 ssDNA 极为稀释的溶液中时监测 ssDNA 随时间的应答十分有趣。图 6A 显示了 ssDNA 探针感化的硅悬臂梁对 RH 的表面应力 (虚线) 和相同感化的悬臂梁在杂交温度 21°C 在 PBS 缓冲液 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na_2HPO_4 ; Ph = 7.5) 中与 1pM 浓度的互补靶 DNA 接触后在不同接触时间 (从 0 小时至 8 小时) 的表面应力。杂交的悬臂梁对

超过 6 小时的探针 - 靶接触具有渐近响应。从脱水至水合状态表面应力单调递减（压缩）至大约 0.2N/m ，大部分降低在 $\text{RH} = 0\%$ 至 25% 之间产生。连接至互补 ssDNA 的 ssDNA 探针对较短接触时间的响应显示了过渡态行为，分别在 $\text{RH} 10\text{-}20\%$ 和 $30\text{-}40\%$ 时观察到两个峰。这些峰可对应 DNA 双链螺旋（A 至 B 形式）的结构转变。

[0108] 完全杂交的互补 DAN(dsDNA) 层在水合 - 脱水循环中显示了极为不同的行为。由于在低 RH 时的水合循环中缺少压应力，滞后被大大降低了。这个主要不同是由于 DNA 与插入的水分子相互作用与 DNA 骨架和核酸碱基成了一种稳定的结构。此外，低 RH（范围 $0\text{-}5\%$ ）时 dsDNA 的压响应，与非杂交 ssDNA 层的张应力相反，可与靶分子和 ssDNA 探针的杂交定性相关。这种作用说明了此系统对于生物传感应用的优越性能。

[0109] III- 该系统的灵敏性和特异性

[0110] 在一个水合 - 脱水循环中可检测的不同参数中，我们发现初始水合期间的表面应力对 DNA 形式例如非杂交的 ssDNA 或杂交的 dsDNA 非常敏感。因此，我们选择了它作为生物传感器的检测参数。在图 6B 中我们绘制了 $\text{RH} = 5\%$ 时响应完全不互补的 ssDNA 阴性对照的表面应力的变化，其和响应感化的悬臂梁是相同的，这是由于不同靶浓度的杂交时间的作用的结果。在所有曲线中，表面应力在与互补序列接触的最初三个小时中快速降低。更重要的是，发现此技术可以检测一小时接触时间的浓度为 1fM 的靶 DNA，检测的信号是 100mN/m 。这远远高于 1mN/m 的系统检测噪声。我们认为此空前的灵敏度与物理立体位阻有关。在高度堆积的 ssDNA 单分子层中，由于水合力的指数和协同性质，相对小数量的双链的形成可对 DNA 膜的综合性质有重要影响。最后，为了确定所开发的生物传感器的特异性，我们将感化的悬臂梁与 $1\ \mu\text{M}$ 的较高浓度的三个错配靶序列接触（图 7）。如前所述，三个错配靶 ssDNAs 设计为：单独 T/T 中间错配的靶“T”、在中间位置三个连续 T/T 错配的靶“TTT”和以三个 A/T 碱基对分隔的三个单独错配 T/T、T/T 和 C/C 的靶“T...T...C”。

[0111] 在这些实验中，对于完全互补的 DNA 来说表面应力随相对湿度降低，而所有错配的 DNAs 具有表面应力的初始增加（拉伸）。有趣的是，这个拉伸的表面应力在所有研究的错配序列中出现峰值，但是峰的位置出现在不同 RHs。由于杂交在 $21\text{ }^\circ\text{C}$ 在所有实验中进行，不希望在全互补和单个错配序列中的杂交范围内出现显著变化（理论计算显示对于靶来说差别温度应在 $34\text{-}43\text{ }^\circ\text{C}$ 的范围中）。我们认为初始水合诱导的拉伸应力是由于双链中错配诱导的“泡”通过氢键的稳定作用。结果，所建立的此方法的一个相关特征是，与 DNA 芯片和其它当前生物传感器中所发生的相反，在最佳的、细微调整的工作温度下错配靶的差别行为与脱水倾向无关，而是与错配诱导的“泡”与水分子在任何远低于其解链温度的温度下的特殊相互作用有关。

[0112] 总之，核酸的单分子层的分子间力严格依赖于水合程度。ssDNA 单分子层的低通透性使得大约每百万个探针大约水合一个靶分子，从而在与水合有关的张力的方式中产生了显著作用。这一原理还可以区分单突变甚至不同错配序列间的差别。任何可检测无标记靶样品的生物传感器都达不到 DNA 单分子层的水合所实现的空前灵敏度。我们预期我们的实验将是室温下不需样品扩增和标记而快速和直接进行基因分型和 SNP 定位的起点。此外，这些新现象可开发用于纳米流控、药物传递和传感的独特潜在应用。

序列表

<110> 高等科研理事会 / 航空航天技术全国学院

<120> 检测样品中选定类型的分子的方法和系统

<130>1. 2007. 0423/MAD

<160>6

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>16

<212>DNA

<213> 合成的寡核苷酸

<400>1

ctaccttttttttctg 16

<210>2

<211>16

<212>DNA

<213> 合成的寡核苷酸

<400>2

cagaaaaaaa aggtag

16

<210>3

<211>16

<212>DNA

<213> 合成的寡核苷酸

<400>3

cagaaaataa aggtag

16

<210>4

<211>16

<212>DNA

<213> 合成的寡核苷酸

<400>4

cagaaattta aggtag

16

<210>5

<211>16

<212>DNA

<213> 合成的寡核苷酸

<400>5

cagtaaataa acgtag

16

<210>6

<211>16

<212>DNA

<213> 合成的寡核苷酸

<400>6

agcttccgta ctcgat

16

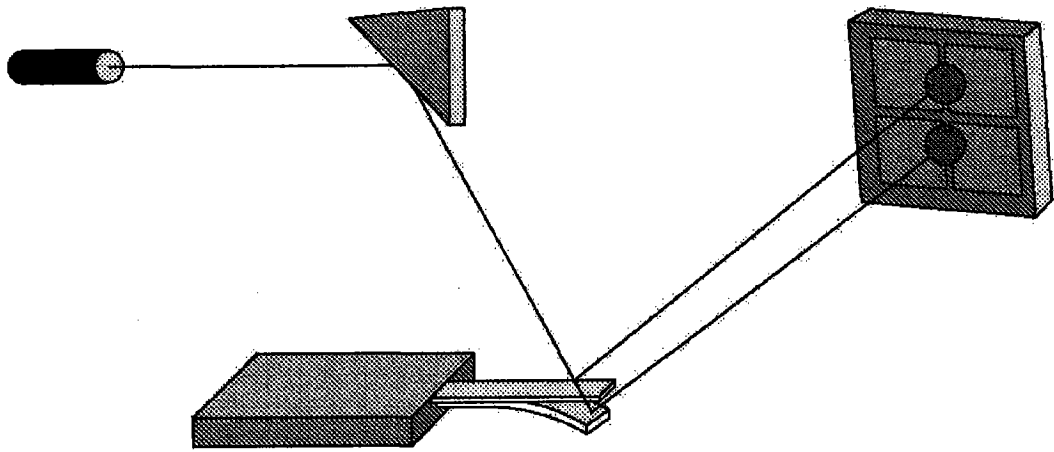


图 1

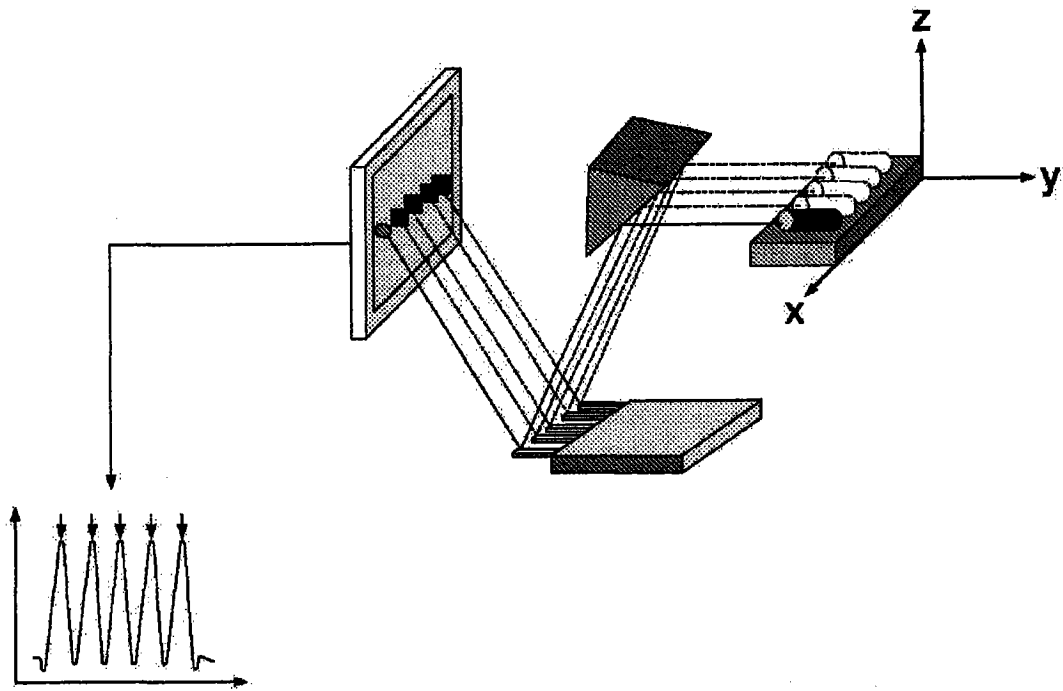


图 2

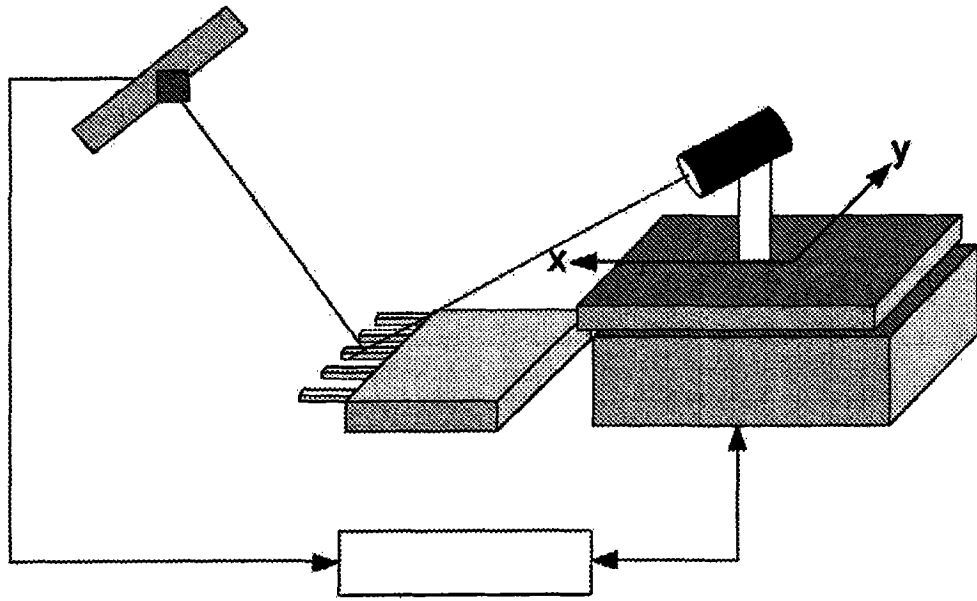


图 3A

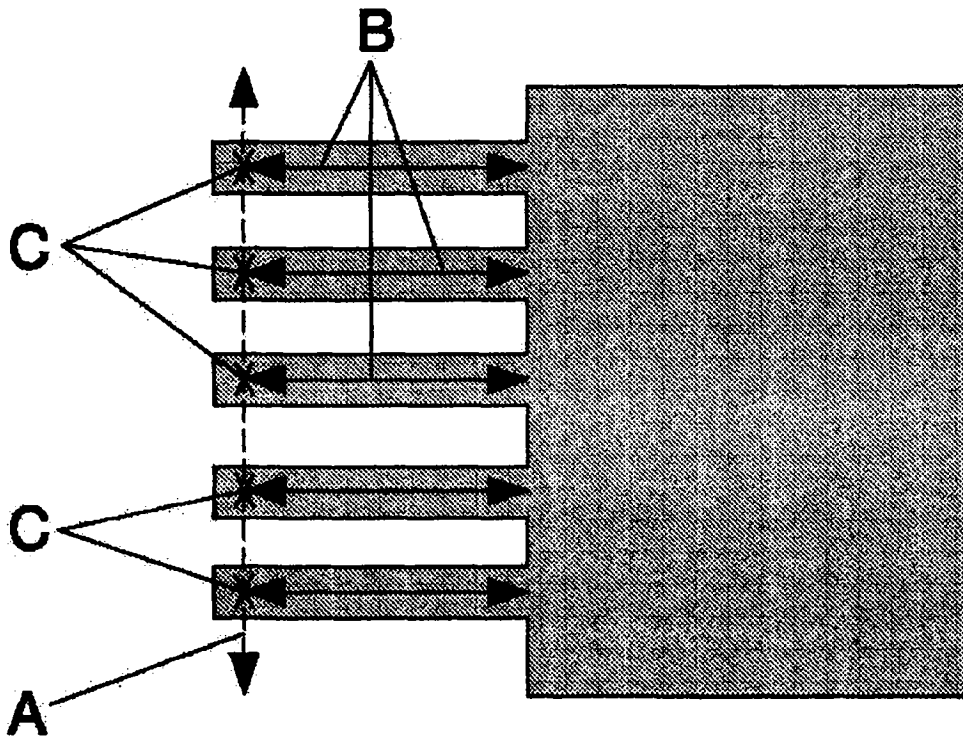


图 3B

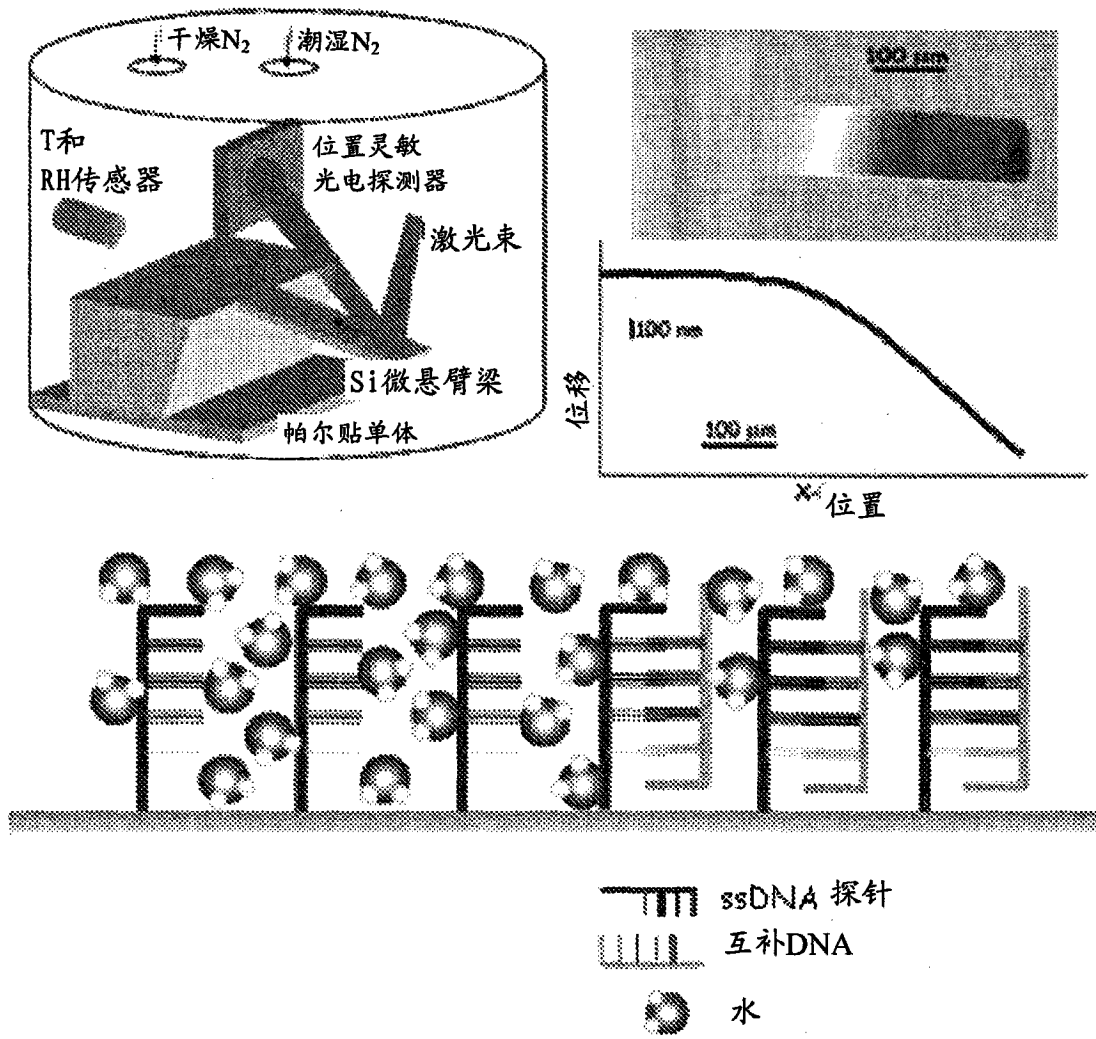


图 4

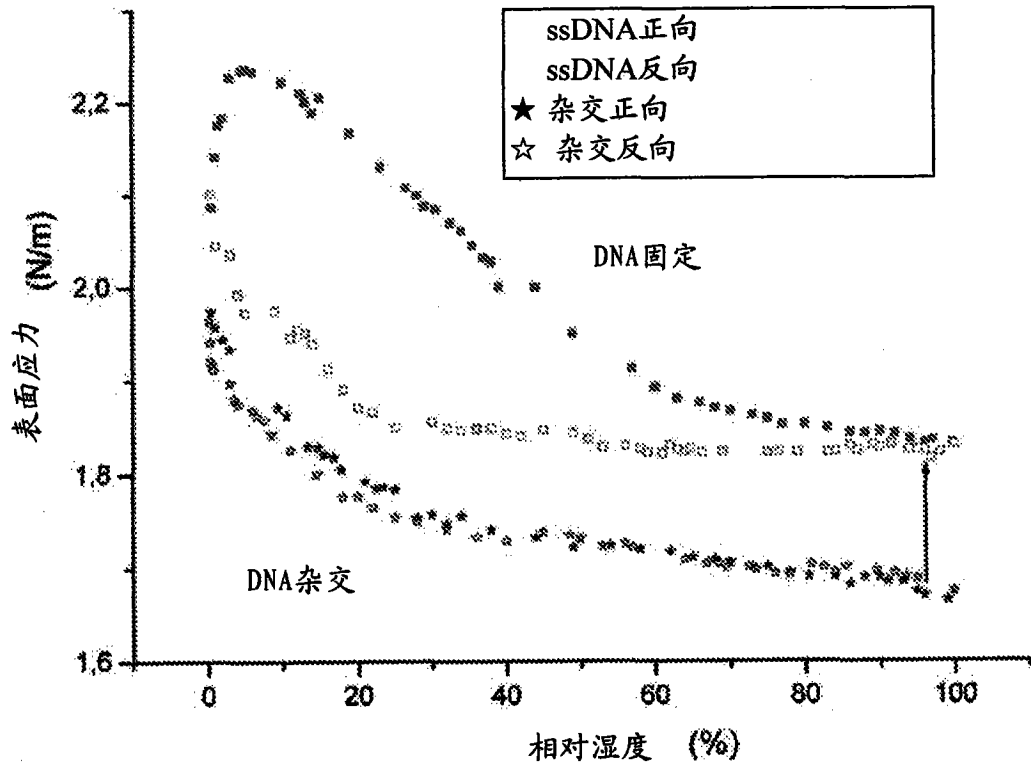


图 5

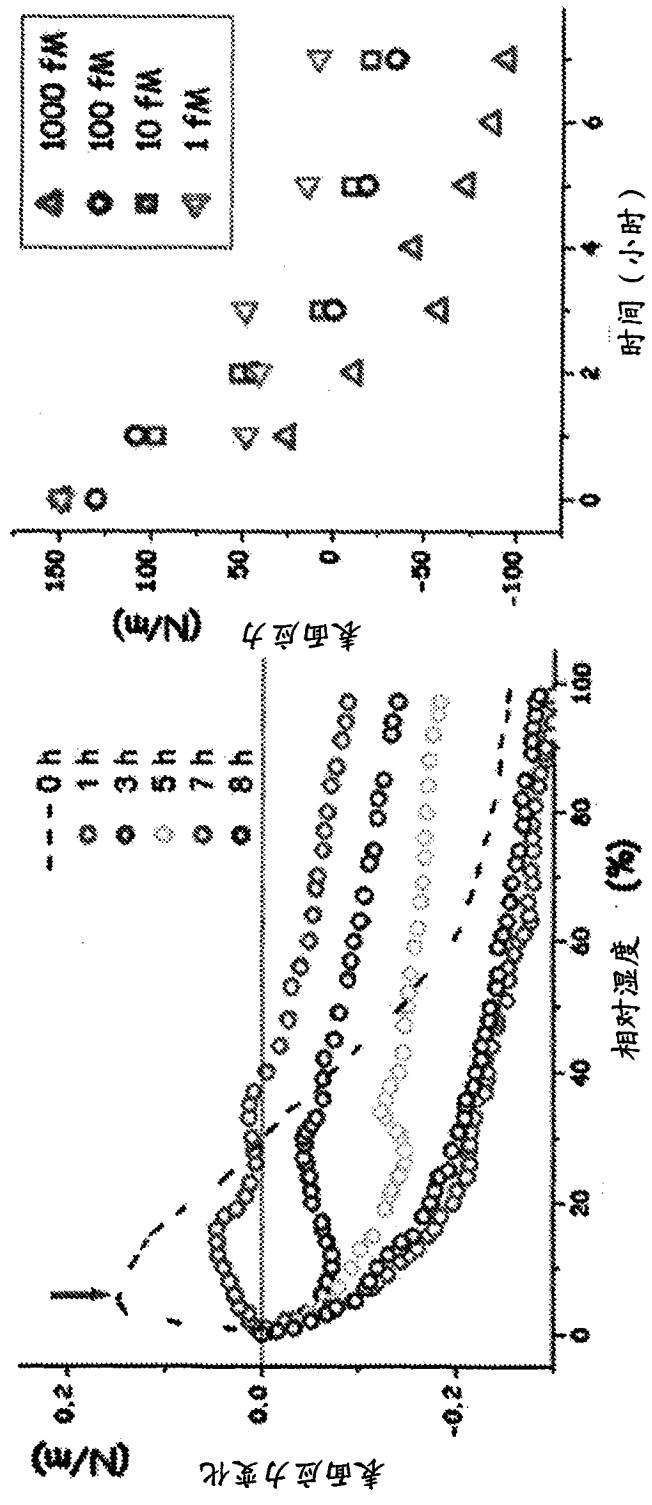


图 6

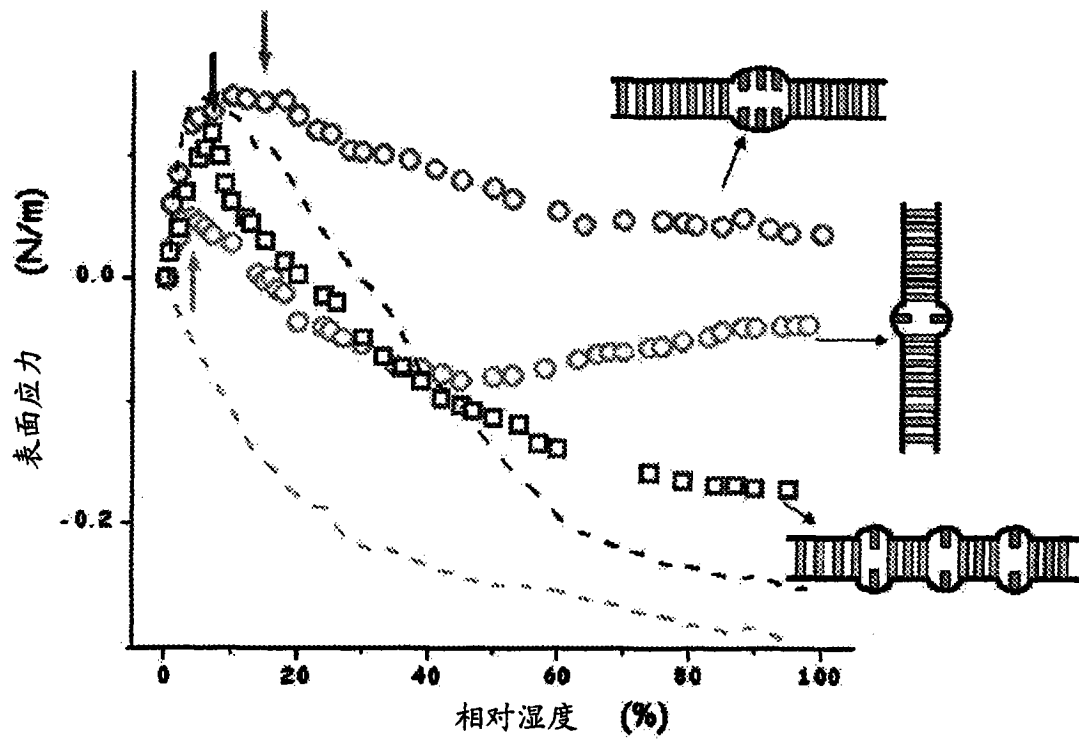


图 7

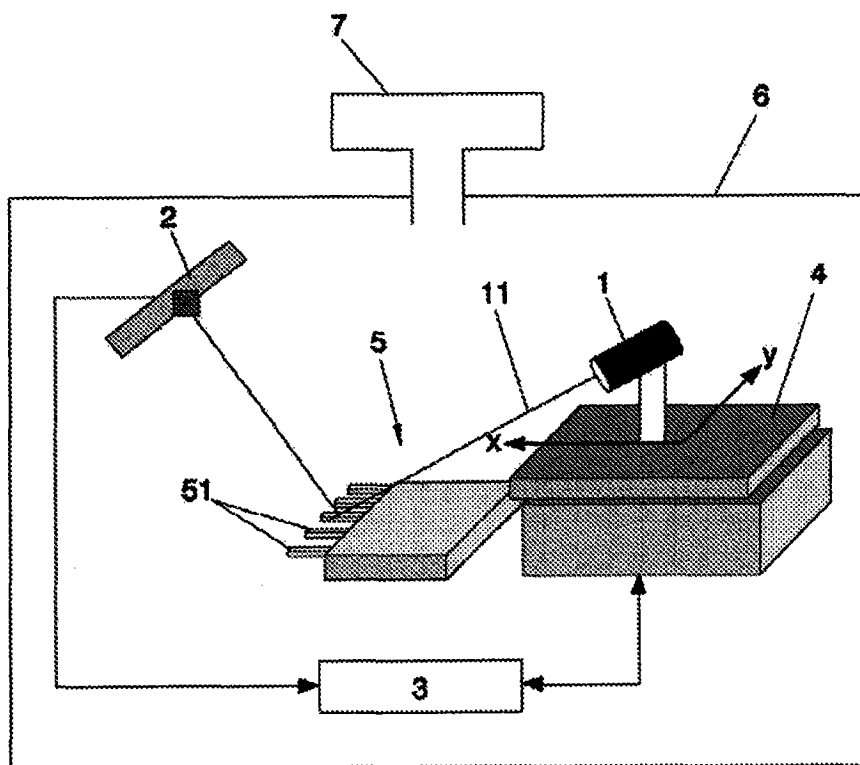


图 8A

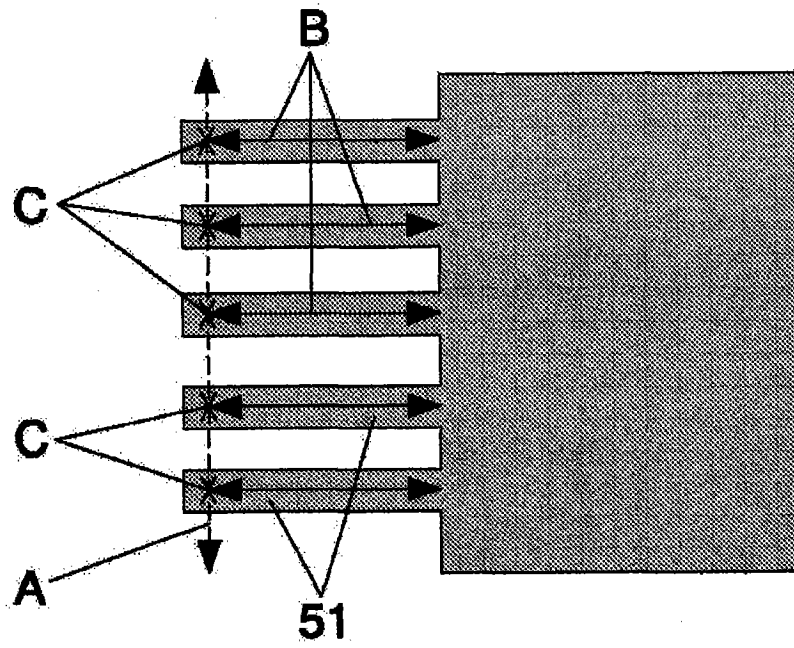


图 8B