



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101842692 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 22

(21) 申请号 200880114481. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 09. 04

G01N 21/55(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

(30) 优先权数据

0717150. 7 2007. 09. 04 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 04. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2008/050783 2008. 09. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02009/030953 EN 2009. 03. 12

(71) 申请人 贝斯 4 创新公司

地址 英国考文垂市

(72) 发明人 卡梅伦·弗雷林

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

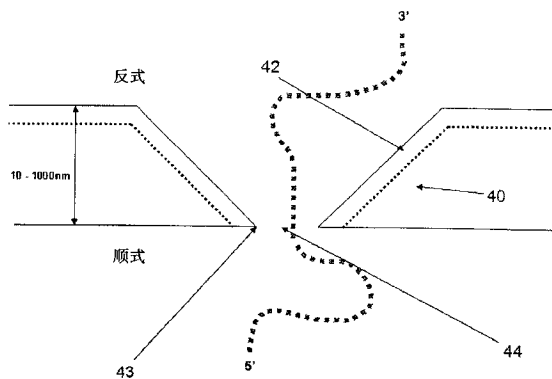
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 4 页

(54) 发明名称

设备和方法

(57) 摘要

用于研究分子的设备,包括处于基底中的通道,能够等离子共振的金属结构部分,其与所述通道结合,所述通道处于适合由所述金属结构部分产生的电磁场与经由所述通道通过的分子相互作用的位置处,用于诱导分子通过所述通道的装置,用于诱导所述金属结构部分中的表面等离子共振的装置;和用于检测由所述金属结构部分产生的电磁场与通过所述通道的分子之间的相互作用的装置。还提供研究分子的方法。



1. 用于研究分子的设备,其包括:
  - 至少一个处于基底中的通道,所述通道适合于分子从其中通过;
  - 至少一个能够等离子共振的金属结构部分,所述至少一个金属结构部分与所述通道结合,所述通道处于适合由所述金属结构部分产生的电磁场与经由所述通道通过的分子相互作用的位置;
  - 用于诱导分子通过所述通道的装置;
  - 用于诱导所述金属结构部分中的表面等离子共振的装置;和
  - 用于检测由所述金属结构部分产生的电磁场与通过所述通道的分子之间的相互作用的装置。
2. 按照权利要求 1 的设备,其包括 2 个由所述基底彼此分开的储存器,第一储存器适合于接受包含待研究分子的样品,且第二储存器适合于所述分子一旦已通过所述通道便进入其中。
3. 按照权利要求 1 或 2 的设备,其中所述通道是孔。
4. 按照前述任一项权利要求的设备,其中所述孔具有约 0.5nm-100nm 的直径。
5. 按照前述任一项权利要求的设备,其中所述孔具有约 1nm-50nm 的直径。
6. 按照前述任一项权利要求的设备,其中所述孔具有约 1nm-30nm 的直径。
7. 按照前述任一项权利要求的设备,其中所述孔具有约 1nm-5nm 的直径。
8. 按照前述任一项权利要求的设备,其中所述孔包括有机小孔。
9. 按照权利要求 1-7 中任一项的设备,其中所述孔以凝胶提供。
10. 按照权利要求 1-7 中任一项的设备,其中所述孔处于基底诸如膜中。
11. 按照权利要求 1-7 中任一项的设备,其中所述孔由选自自由多孔金、胶体晶体、胶体腔和金属环组成的组的纳米孔材料形成。
12. 按照前述任一项权利要求的设备,其包括多个穿过所述基底的孔。
13. 按照权利要求 12 的设备,其中所述孔以阵列排列。
14. 按照前述任一项权利要求的设备,其中所述金属结构部分包括金、银、铜或铝。
15. 按照前述任一项权利要求的设备,其中所述金属结构部分是基本球形的。
16. 按照权利要求 1-14 中任一项的设备,其中所述金属结构部分是基本环形的。
17. 按照权利要求 1-14 中任一项的设备,其中所述金属结构部分是多边形棱柱。
18. 按照前述任一项权利要求的设备,其中所述金属结构部分具有 50nm-150nm 的直径。
19. 按照前述任一项权利要求的设备,其中定位所述金属结构部分以使得在所述分子通过所述通道时,与所述分子相距 50nm 以下。
20. 按照前述任一项权利要求的设备,其中用于诱导分子通过所述通道的装置包括用于诱导电泳的装置、微射流装置、或激光捕集装置中的一种或多种。
21. 按照前述任一项权利要求的设备,其包括用于控制所述分子朝向、进入和 / 或经过所述孔通过的控制装置。
22. 按照权利要求 21 的设备,其中所述控制装置包括所述分子由其中通过的多孔基质,所述多孔基质位于紧邻所述通道的入口处。
23. 按照前述任一项权利要求的设备,其中所述用于检测所述金属结构部分和所述分

子之间的相互作用的装置包括用于检测荧光的装置或用于检测拉曼散射的装置。

24. 按照权利要求 23 的设备,其中所述用于检测荧光的装置包括光电倍增管或雪崩光电二极管。

25. 按照权利要求 23 的设备,其中所述用于检测拉曼散射的装置包括拉曼分光计。

26. 用于研究分子的方法,其包括以下步骤;

- 提供包含待研究的分子的流体样品;

- 诱导所述分子通过处于基底中的通道,所述通道具有结合的金属结构部分,所述金属结构部分被诱导具有等离子共振;和

- 在所述分子通过所述通道时,检测由所述金属结构部分产生的电磁场和所述分子之间的相互作用。

27. 按照权利要求 26 的方法,其中所述分子是生物学分子。

28. 按照权利要求 27 的方法,其中所述分子是核酸。

29. 按照权利要求 26-29 中任一项的方法,其中所述分子包括与所述金属结构部分相互作用的标记物。

30. 按照权利要求 29 的方法,其中所述标记物是荧光团。

31. 按照权利要求 30 的方法,其中所述标记物是玫瑰红、C<sub>5</sub>-马来酰亚胺、C<sub>2</sub>-马来酰亚胺、若丹明红、C<sub>2</sub>-meleimide、和若丹明绿之一。

32. 按照权利要求 31 的方法,其中所述标记物具有比所述金属结构部分的局部化表面等离子共振峰能量略低的发射峰。

33. 适合用在用于研究分子的设备中的基底,其包括:

- 至少一个处于所述基底中的通道,所述通道适合于分子从其中通过;和

- 至少一个能够使等离子共振被诱导的金属结构部分,所述至少一个金属结构部分与所述通道结合,所述通道处于使得由所述金属结构部分产生的电磁场能够与经由所述通道通过的分子相互作用的位置处。

## 设备和方法

[0001] 本发明涉及用于研究分子、特别是生物学分子诸如核酸或蛋白的设备和方法。本设备和方法涉及纳米等级技术的应用到迅速和详细分析这些分子的问题。在一方面,本发明涉及测序核酸的设备和方法。

[0002] 迅速测试核酸的能力在生物学中保持最高的重要性。尽管现在已知许多基因组(包括人)的完整序列,且将可获得许多更多的序列,但是由于许多原因仍保持对获得序列数据的需要。目前的测序技术主要基于 Sanger (“双脱氧”) 技术且费力费时。包括检测通过聚合酶引入单核苷酸的方法固有地受到聚合酶能合成互补 DNA 链的相对较低速率的限制。目前,关于单测序装置的最大测序速率是约 1 碱基 / 秒 ; 尽管是超越常规 Sanger 测序技术的进步,但仍然非常缓慢。

[0003] 提议了通过检测当 DNA 通过导电孔时的电流变化来测序 DNA 的方法。尽管这样的方法具有高理论最高检测速度,但是至今为止仅获得相对低的检测速率,且似乎很可能在不彻底改变总设计或使用导电标记的条件下,检测的限制将保持很低。

[0004] 纳米技术,如同生物学,是迅速发展的领域且产生用于处理和分析分子的新型方法和材料。纳米技术人员现在能够生产和处理低至纳米以下等级的材料。这提供发展具有新的且以前从未考虑过的潜力的装置或技术的潜力。然而,尽管纳米技术在例如,电子工业中发现了功用,但是其尚未广泛用于生物学领域中。

[0005] 等离子共振是这样的现象,其中金属表面上的等离子受到该表面上光入射的激发。等离子共振用于大量常规分析仪,诸如 **Biacore®** 中。在激发平面上的等离子的情形中,使用术语表面等离子共振 (SPR),且在激发纳米尺寸的颗粒的情形中,经常使用术语局部表面等离子共振 (LSPR) 来区分这方面现象。当光照射小金属颗粒时,振荡电场导致所述颗粒的电子相干振荡。这些电子的共同振荡称为偶极等离子共振。电子云中的共同振荡产生强烈的、高度局部化的电磁场 (EMF)。为了产生这些共同振荡,必须使用正确的激发波长。该波长应该取决于被激发的金属颗粒或纳米结构物的尺寸和形状。

[0006] 已经发现,通过使用可以用纳米技术获得的高度局部化的 SPR,可以在纳米等级研究生物学分子的结构。

[0007] 根据本发明,提供用于研究分子的设备,其包括:

[0008] - 至少一个处于基底中的通道,所述通道适合于分子从其中通过;

[0009] - 至少一个能够等离子共振的金属结构部分,所述至少一个金属结构部分与所述通道结合,所述通道处于适合由所述金属结构部分产生的电磁场与经由所述通道通过的分子相互作用的位置处;

[0010] - 用于诱导分子通过所述通道的装置;

[0011] - 用于诱导所述金属结构部分中的表面等离子共振的装置;和

[0012] - 用于检测由所述金属结构部分产生的电磁场与通过所述通道的分子之间的相互作用的装置。

[0013] 适当地,所述设备包括两个储存器:第一储存器适合于接受包括待研究分子的样品,且第二储存器适合于所述分子一旦通过所述通道便进入其中。合适地,这两个储存器彼

此通过基底分开,且分子必须通过至少一个通道而从第一储存器进入第二储存器。因此所述基底可以被认为是分开这两个储存器的膜或隔膜。

[0014] 一般地,所述通道的尺寸应该适合于待研究的分子通过该通道,且这样迫使该分子以合适地靠近所述金属结构部分来通过,以使所述分子和由金属结构部分产生的局部化 EMF 之间发生相互作用。所述通道通常也应该具有合适的尺寸,以使得每次仅一个分子可以通过该通道。

[0015] 一般地,优选的是该通道是孔,尽管其也可能是其他通道形式,诸如处于基底中的缝或槽也可以是合适的。

[0016] 所述孔可以具有任何合适的形状,尽管最容易想到圆形或近似圆形的孔。

[0017] 所述孔(或通道)可以具有约 0.5nm-100nm,优选 50nm 以下,尤其 30nm 以下的直径。尽管使用术语直径,但应该理解这不意味着严格的几何学含义且可以,例如应用于非圆形孔或通道的最小维度。

[0018] 通常,基底中的小孔(small apertures)称为“小孔(pores)”,且该术语可以贯穿说明书中使用,且应该得到相应的解释。

[0019] 在待研究的分子是核酸的情形中,单链核酸通过的最小孔是约 1nm。双链核酸应该通过约 2nm 以上的孔[见 Heng J. B. 等 Biophysical Journal(生物物理学杂志)(2006), 90, 1098-1106]。

[0020] 因此,在研究单链核酸的情形中,优选地,所述孔的直径应该是 1nm-100nm,优选 1nm-30nm,尤其是 1-10nm,特别地 1-5nm。对于双链核酸,所述孔的直径应该是 2nm-100nm,优选 2nm-30nm,尤其是 2nm-4nm。

[0021] 所述通道可以由任何合适的物质形成。其可以是有机的或无机的。

[0022] 在一个实施方案中,所述孔可以由“有机”小孔,即源自天然存在的结构,例如具有小孔的蛋白质诸如  $\alpha$ -溶血素的小孔或线粒体外膜中存在的有机小孔形成。

[0023] 备选地,所述孔可以由常规用于处理核酸或其他生物学分子的凝胶,诸如琼脂糖或聚丙烯酰胺提供。

[0024] 备选地,所述孔可以在基底,诸如由氮化硅或其他这样的物质形成的膜中改造。参见,例如,Ho C. 等,PNAS(2005),102(30)10445-10450,其中讨论了由氮化硅形成纳米直径小孔的方法。

[0025] 所述孔还可以由纳米孔材料诸如多孔金,胶体晶体,胶体腔,金属环等形成。Netti 等描述了金纳米腔的形成及其形成表面等离子体的能力[见 Netti M. C. 等 Advanced Materials(高级材料)(2001),13(18),1368-1370]。Aizpurua O. 等描述了金纳米环的形成[见 Aizpurua 等 Physical Review Letters(物理学综述书信)(2003),90(5), 057401-1-057401-4]。Lesuffleur 等讨论了具有增强的等离子体共振的金纳米孔阵列[Lesuffleur A. 等, Applied Physics Letter(应用物理学书信)(2007),90, 243110]。在孔本身由能够展示 LSPR 的金属物质形成的情形中,则可能不需要单独的金属结构部分应该是显然的。

[0026] 用于纳米-工程以产生多种适合于本发明的结构的装置是公知的,但其也是迅速发展的技术领域。同样地,预期将来将开发适合于形成如本发明所需的处于基底中的通道的新型技术和材料,这样的技术属于本发明的范围。

[0027] 通常优选地,所述设备包括多个通过基底的孔。所述孔可以以阵列形式排列,其中每个孔的位置受到控制;这在使用纳米-工程形成处于基底中的孔的情形中特别方便。备选地,孔可以分散在基底上,其位置不受控制。

[0028] 金属结构部分必须能够形成表面等离子并由此在该结构部分附近处形成局部化 EMF。任何适合于获得该功能的材料适合用于该金属结构部分。已经发现金、银、铜和铝金属在等离子形成和传播方面具有理想特性,并且因此,金属结构部分主要或完全由这些金属中的一种或多种形成通常是优选的。

[0029] 纳米技术容许形成基本任何形状的金或银颗粒。形状可以对由颗粒产生的 EMF 具有重大影响 [见 Mock J. J. 等, *Journal of Chemical Physics*(化学物理学杂志), 116(15), 6755-6759]。

[0030] 球形或基本球形(例如,球体或扁球体)颗粒具有适合的特性且由此形成金属结构部分的合适的实施方案。已经发现具有 50nm-150nm 的直径的球形金属颗粒是特别适合的,这归因于高水平的荧光增强 [见 Nakamura 和 Hayashi, *Japanese Journal of Applied Physics*(日本应用物理学杂志), 44(9A), 6833-6837]。

[0031] 在备选的实施方案中,可以使用环形金属结构部分。所述环形结构部分具有某些益处;已经显示出环内的 EMF 很强,且在由环限定的内部区域内相对恒定 [见 Aizpurua 等, 同前]。在金属结构部分是环形的情形中,该环本身可以形成使分子通过其中的孔应该是显然的。制备所述纳米-环的方法记述在 Aizpurua 等中。

[0032] 其他形状诸如多边形棱柱或其他多边形形状也可能是适合的。

[0033] 为了清楚,指出可以有多个金属结构部分与具体的通道结合,且可以使用多种类型的金属。实际上,使用两种以上金属材料是理想的,以使得产生最大 EMF 区,这是组合每个结构部分的可分开的 EMF 的结果。这可以在高度局部化的区域内引起非常高的 EMF 值。

[0034] 通常重要地是,将金属结构部分排列在这样的位置,以使得其与通过所述小孔的分子相互作用,但与所述小孔具有充足的间隔,以防止或减弱对由该分子发射的信号猝灭。这可以以许多方式实现。所述通道可以具有这样的形状和尺寸,以使得通过其中的分子被限定在这样的位置,即其既不过份靠近(因此避免猝灭),也不过分远离(因此确保相互作用)金属结构部分——这在所述小孔本身不具有猝灭活性时尤其适合。备选地,可以用控制装置来引导分子,以使其不过份靠近金属结构部分。

[0035] 典型地,金属结构部分的表面应该定位在距通过通道的分子 50nm 以下,优选 30nm 以下,尤其 10nm 以下。

[0036] 用于诱导分子通过通道的装置可以是诱导电泳的装置、微射流装置、或激光捕集装置中的一种或多种。然而,任何其他适合于诱导分子运动到和/或通过所述通道的装置也可以是合适的。

[0037] 所述设备可以包括用于控制分子朝向、进入和/或经过所述孔通过的控制装置。所述控制装置可以适合于控制速率、方向、位置或分子构象中的一种或多种。

[0038] 控制装置的类型应该根据待研究的分子的类型和所需控制的类型而变化。在需要测序核酸的情形中,控制线性核酸分子经过通道的通过速度非常重要。为了测序,还需要使核酸分子保持为线性构象。

[0039] 在一个实施方案中,控制装置可以包括分子由其中通过的多孔基质,所述多孔基质位于紧邻通道入口处。在使用多孔基质的情形中,如果通过电泳诱导分子通过该基质,则很方便。多孔基质的特性与电泳条件的结合适合于容许精细控制分子(例如核酸)经过所述基质和进入通道的运动。可以实现对核酸经过凝胶的运动速度的精确控制。经过多孔基质电泳的另一个优势是线性分子的构象被拉出到延长的线性形式,该形式特别适合于测序。合适的多孔基质可以由用于处理核酸和蛋白质的常规材料,诸如聚丙烯酰胺或琼脂糖形成。备选地,其他纳米-多孔材料也可以是适合的。

[0040] 上述控制装置充分适合于控制核酸和其他线性分子。其他的分子可能需要不同水平的控制,或控制的程度可能更高或更低。

[0041] 应该注意到,用于诱导分子通过所述通道的装置和控制装置可以以相同手段提供。例如,单独的在液体介质中电泳可以适合于在不需精确控制构象和速率的情形中控制分子。备选地,激光捕集可以用于精确控制分子朝向和进入通道的运动。

[0042] 用于检测金属结构部分与分子的相互作用的装置当然可以是检测由所述结构部分产生的局部化 EMF 和与其靠近的分子之间的相互作用的任何合适装置。合适的装置可以包括用于检测荧光的装置或用于检测拉曼散射的装置。

[0043] 用于检测荧光的合适装置包括足够灵敏以检测由通过 EMF 区的荧光团发射的光子的任何装置。合适的装置包括光电倍增管或雪崩光电二极管。荧光适合于检测固有荧光性分子或用荧光团标记的分子。

[0044] 用于检测拉曼散射的合适装置包括拉曼分光计。拉曼散射可以用于检测未标记的和非荧光性分子。用于检测拉曼散射的技术在本领域中是公知的。本发明中利用拉曼散射的检测基于表面增强的拉曼光谱学现象[背景参见 Jeanmaire, David L.; Richard P. van Duyne(1977). " Surface Raman Electrochemistry Part I. Heterocyclic, Aromatic and Aliphatic Amines Adsorbed on the Anodized Silver Electrode(表面拉曼电化学部分 I. 吸附在阳极化处理的银电极上的杂环、芳族和脂族胺)" . Journal of Electroanalytical Chemistry(电分析化学杂志)84:1-20.]。

[0045] 在许多实施方案中,使用不依赖于标记分子的检测方法可以是优选的。这简化待研究样品的制备,并且也不需要存在可能干扰分子经过通道的标记物。

[0046] 在另一方面,本发明提供用于研究分子的方法,其包括以下步骤;

[0047] - 提供包含待研究的分子的流体样品;

[0048] - 诱导所述分子通过处于基底中的通道,所述通道具有结合的金属结构部分,所述金属结构部分被诱导具有等离子共振;

[0049] - 在所述分子通过所述通道时,检测由所述金属结构部分产生的电磁场与所述分子之间的相互作用。

[0050] 优选地,所述分子是生物学分子,例如核酸或蛋白质/肽。线性分子诸如核酸或线性蛋白/肽特别适合于利用本发明方法来研究。单链核酸尤其适合于利用本发明方法来研究。

[0051] 在优选的实施方案中,所述方法是测序核酸的方法。

[0052] 然而,所述方法也可以用于研究其他类型的分子,并不需要用于进行测序。在其他潜在应用中,设想了所述方法用于计数样品中的单独分子和定位线性分子上标记的应用。

[0053] 尽管不是必需地,所述分子包括与金属结构部分相互作用的标记物可以是优选的。因此,所述方法还可以包括用将与所述金属结构部分相互作用的标记物标记所述分子的步骤。

[0054] 合适的标记包括荧光团。荧光团在与荧光标记全部类型生物学分子有关的领域中是公知的。在本发明中,荧光团足够小以使得其不抑制被标记分子通过所述通道是非常重要的。典型地,荧光团应该具有 2nm 以下的有效尺寸,且优选是任何维度测距小于 1nm 的染料分子。

[0055] 合适的荧光团的实例包括玫瑰红, Alexa Fluor 488 C<sub>5</sub>-马来酰亚胺, Alexa Fluor 532 C<sub>2</sub>-马来酰亚胺和若丹明红 C<sub>2</sub>-meleimide, 和若丹明绿。这些荧光团可以分别用于利用本领域中已知的技术来标记核酸的碱基。

[0056] 适当地,所述分子是在其中标记了特殊碱基的大部分或全部的核酸。在优选的实施方案中,标记分子中的一种或多种碱基的大部分或全部,每种类型的碱基包含具有可分别鉴定放射谱的标记物。在特别优选的实施方案中,标记全部,或基本全部碱基,每种类型的碱基包含具有可分别鉴定放射谱的标记物。在 Tasara 等, Nucleic Acids Research (核酸研究), 2003, 31 (10), 2636-2646 中讨论了核酸的高密度标记。

[0057] 选作标记物的荧光团能够与由金属结构部分产生的 EMF 相互作用是非常重要的。使荧光团与特殊特性的金属结构部分相匹配是常规方式。通常,为了金属结构部分和荧光团之间良好相互作用,优选地,荧光团具有比金属结构部分的局部化表面等离子共振峰能量略低的发射峰,即荧光团发射峰由 LSPR 峰略微红移。红移约 20-150meV 是合适的,优选约 40-120meV [见 Chen 等, Nano Letters (纳米书信) (2007), 7 (3), 690-696]。

[0058] 根据另一方面,本发明提供适合用在用于研究分子的设备中的基底,所述设备包括:

[0059] - 至少一个处于基底中的通道,所述通道适合于分子从其中通过;和

[0060] - 至少一个适合于在其中诱导等离子共振的金属结构部分,所述至少一个金属结构部分与所述通道结合,所述通道处于使得由所述金属结构部分产生的电磁场能够与经由所述通道通过的分子相互作用的位置处。

[0061] 优选基底的其他详细信息记述在上文中。

[0062] 现将通过非限制实施例,参考附图描述本发明的实施方案,其中:

[0063] 图 1 显示适合用于本发明中的小孔和电极;

[0064] 图 2 显示包括小孔和电极的基底;

[0065] 图 3 显示按照本发明的设备的方面的图示;

[0066] 图 4 显示按照本发明的设备的实施方案的图示;和

[0067] 图 5-7 显示所述基质的备选结构的图示。

[0068] 背景

[0069] 当光照射小球形金属颗粒时,振荡电场导致颗粒的电子相干振荡。这些电子的共同振荡称为偶极等离子共振。电子云中的共同振荡产生强烈的、高度局部化的电磁场 (EMF)。为了产生这些共同振荡,必须使用正确的激发波长。该波长应该取决于被激发的金属颗粒的尺寸和形状。关于具体颗粒的正确波长可以容易地通过实验来确定或,对于某些形状,可以利用已知的建模技术来预测。



[0070] [1] 中已经显示由金属胶体诸如金或银纳米颗粒的等离子共振产生的 EMF 可以用于激发常用的荧光标记诸如, 特别地, Cy5 和玫瑰红。这些实验包括将金或银纳米颗粒置于表面上并定位荧光团以使得它们受益于增强的 EMF。这导致所谓的金属增强的荧光性 (MEF)。

[0071] 当将荧光团置于展示等离子共振的金属颗粒附近时, 该荧光团受益于局部化的 EMF 和没有得到充分理解的其中荧光寿命缩短的现象。当检测分子的拉曼散射时, 发生类似的现象。在分子如果紧密靠近展示局部化表面等离子共振的金属颗粒的情形中, 观察到拉曼散射水平的显著增大。

[0072] 由于荧光团的最大光子发射通过其量子产率和荧光寿命确定, 所以较短的荧光寿命导致较高的光子发射。具有 90% 量子产率和 2.5ns 荧光寿命的荧光团可以发射最大 360 百万个光子 / 秒。实际上, 荧光染料可以在衰退前发射数百万光子。

[0073] 通过诱导高度局部化增强的 EMF, 诸如已经利用金和银胶体阵列, [1, 2] 以及在胶体纳米晶体 [3], 光子晶体纳米腔 [4], 金属纳米环 [5] 和多孔金属薄膜 [6] 中示范的那些, 和定位荧光团以使其从中受益, 可以诱导 MEF 并检测荧光团, 或备选地, 检测拉曼散射。

[0074] 如果制备装置, 以使得存在在任意给定时刻只有一个荧光团可以受益于 MEF 的区域, 则该荧光团的位置可以已知。通过在孔 (小孔) 周围或邻近处安排等离子结构 (例如, 金属结构部分), 可以定向荧光颗粒, 以使其通过最大荧光增强 (MaxFE) 区域。合适的小孔包括: 凝胶 (常用于限制多核苷酸), 有机小孔诸如  $\alpha$ -溶血素, 固态小孔诸如可由氮化硅制成的那些, 纳米孔材料诸如多孔金、胶体晶体、胶体腔、金属环, 或直径小于 10nm 且优选直径小于 5nm, 尤其 1.5-2.5nm 之间的任何其他小孔。

[0075] 假设以下内容:

[0076] - 两个等离子共振表面之间的 EMF 在它们之间的距离减小时增大,

[0077] - 靠近等离子共振表面也缩短荧光团的荧光寿命,

[0078] - 这些表面之间的距离可以小于 5nm,

[0079] - 且可以以小于 2nm 的尺寸制备胶体、多孔薄膜、2D 晶体阵列、和其他纳米结构,

[0080] 假设可以使最大光子发射发生在非常小的区域内是合理的。

[0081] 以类似的方式, 分子的具体特性, 或分子内的区域, 可以通过拉曼散射的特有模式识别。这, 在识别具体荧光团位置时, 具有可识别的拉曼谱的特殊性质的位置可以通过其与等离子结构的靠近来确定。

[0082] 如果通过例如微射流或电泳方式诱导离子通过小孔, 则可以使其通过该 MaxFE 区域, 以使得可以检测单离子-荧光团缀合物, 或具有特殊拉曼谱的区域。

[0083] 通过诱导荧光标记的带电离子诸如蛋白质通过纳米孔以使得每次仅一个离子可以经由该小孔行进, 那些离子的量化可能如下:

[0084] - 给定两个相同的荧光颗粒 / 离子缀合物, 当第一个通过所述小孔并进入受限的 EMF 时, 荧光团将开始发射光子。当荧光团移动靠近 MaxFE 区域时, 发射增加数量的荧光团。因为光子发射与 EMF 强度直接相关, EMF 强度又随着到 MaxFE 区域的距离减小而指数增大, 所以光子发射也将指数增大, 由此在 MaxFE 区域内产生光子发射峰并随着所述缀合物移动远离 MaxFE 区域而减小。第二相同荧光颗粒将产生相同模式的光子发射。只要峰光子发射在具有小于两个荧光团 / 离子缀合物之间的距离的厚度的离散区域内发射, 则可以区分由

这两个荧光团产生的荧光性。

[0085] - 当这两个缀合物间隔如此靠近在一起（小于 0.5nm）以致于很难单独检测时，MaxFE 区域内多于一个荧光团的存在可以通过光子发射确定。暴露于相等 EMF 强度的 2 个相同荧光团应该发射是单荧光团的大约 2 倍那么多的光子。假设 MaxFE 区域可以包含 2 个、3 个或更多缀合物，则如果已知它们经过 EMF 行进的速度，则可以实现通过 EMF 的缀合物数量的量化。

[0086] 通过构建 2 个由隔板分开的室，所述隔板确保离子仅能通过小孔由一侧到达另一侧，无论 MaxFE 区域可以包含 2 个、3 个或更多缀合物，只要该数量已经确定，则可以量化可以被诱导移动的离子。

[0087] 标记核酸

[0088] 荧光标记物通常引入单链 (ss) 和双链 (ds) 多核苷酸 DNA 和 RNA。存在许多充分确定的用于将荧光标记物引入到 DNA 的方法，且通过小心选择 DNA 聚合物和荧光修饰的核苷酸，显示出 [7] 可能荧光标记四种碱基 (CGTA) 中的一种或多种的全部。已知 dsDNA 和 dsRNA 中的核苷酸之间的距离为 0.34nm，而在 ssDNA 和 ssRNA 中，聚合物可以处于线性构象，从而容许最大空间间隔变得更大——尽管准确的距离根据施加的张力在 0.5-1nm 之间变化 [8]。

[0089] 测序方法

[0090] 已知可以实现对单链 DNA 通过有机小孔诸如  $\alpha$ -溶血素 [10] 或固态氮化硅小孔的速度的精确控制 [8,9]。通过标记多核苷酸从而使其一种或多种碱基的全部被荧光标记，和通过微射流、电泳或一些其他方式诱导该多核苷酸以已知速度通过 EMF，从而使核苷酸通过可能包含至少一个荧光标记的核苷酸的 MaxFE 区域可以确定标记的核苷酸沿着 DNA 片段的位置。

[0091] 完整多核苷酸序列可以以下列方式装配：

[0092] 假定都同时标记一种碱基的全部，则可以进行四个 PCR 反应，其中在每个反应中，荧光标记全部 C, T, G, 或 A 核苷酸碱基。然后链变性 - 形成 ssDNA 或 ssRNA。再诱导每条链以已知的速度通过纳米孔和通过能够包含已知数量的核苷酸的 MaxFE 区域。当标记的核苷酸通过 EMF 时，它们的位置可以相对于其他标记的核苷酸来确定——为四个相同但区别标记的多核苷酸中的每一个提供距离图。然后这四幅距离图可以容易地组合为完整的多核苷酸序列。

[0093] 全基因组测序：

[0094] 为了利用该方法测序基因组，可以使用荧光标记的随机引物，诸如可用于全基因组扩增的那些。这些引物的序列应该是已知的，且荧光标记可以在通过所述小孔时，起指示 DNA 片段 5' 或 3' 方向的作用。标记的引物也应该起初始参考点的作用，标记的核苷酸的距离图可以由该初始参考点相关联。优选地，四种碱基中多于一种的全部被荧光标记且应该使用具有不同发射谱的荧光标记物来区分这些碱基。还可以使用多于一种荧光标记谱来标记一种碱基类型的全部，条件是该标记物具有截然不同的最大发射谱。

[0095] 然后可以诱导这些 DNA 片段以通过光子发射确定的速率通过如上所述的小孔。利用染料 Cy5，获得 MEF 的光子发射速率为 3-9 百万光子 / 秒 [1]。这可以容许 DNA 以略低于 1 百万核苷酸碱基 / 秒 / 纳米结构的速率通过。纳米结构阵列应该容许该速度提高到乘以

阵列的尺寸。由于这些引物是随机的且基因组中 DNA 片段的距离图的位置未知,所以应该需要全基因组装配软件诸如用于完整鸟枪法测序的那个来精确比对和装配。

[0096] 本发明的优点

[0097] 本发明提供多种超越其他 DNA 测序方法以及其他单分子检测方法的优点:

[0098] - 本发明容许增强的单分子检测。

[0099] - 本发明可以用于确定单分子的位置和速度。

[0100] - 尽管 PCR 可以用于荧光标记单分子,但是本发明的设备和方法不依赖于化学或酶反应。

[0101] - 所述设备可以被排列为阵列,以便数十、数百、数千或数百万的这些纳米结构可以同时运行。

[0102] - 利用以上概述的方法的 DNA 测序应该非常快。利用该方法测序的成本应该仅限于不超过四种 PCR 反应物诸如荧光标记物、核苷酸、聚合酶和其他少量消费品的成本。

[0103] 构建方法

[0104] 本发明的中心在于诱导单分子以受控的方式通过高度局部化的 EMF 并检测该分子和 EMF 之间的相互作用。存在许多充分研究的控制蛋白和多核苷酸的方法,包括凝胶、有机小孔、固态小孔、附着到珠、和固定在表面上。这容许构建广泛范围的可以控制单分子诸如蛋白或 DNA 片段使其可以通过高度局部化 EMF 的装置。

[0105] 本发明容许使用任何表面,条件是由入射 EMF 诱导的等离子共振将在荧光标记的单分子或 SERS 中诱导 MEF,且可以诱导单分子通过 MaxFE 区域。

[0106] 本发明容许任何诱导单分子通过 MaxFE 区域的手段,包括微射流、电泳、或激光捕集。

[0107] 在选择荧光作为检测方法的情形中,本发明容许使用任何将以所用表面的最大等离子共振频率发荧光的荧光标记物。理想地,所述荧光标记物应该具有高量子产率,低荧光寿命,低分子量,且易于通过聚合酶引入。优选地,核苷酸本身固有地具有荧光性。

[0108] SERS 具有不需要标记的优点,而待鉴定的分子的特异性拉曼谱特性应该是已知的。

[0109] 这些特征容许以至少三种一般方式改造本发明,其中每种具有不同的优点:

[0110] - 使用“有机”小孔来控制单分子容许金纳米颗粒共价结合小孔本身或周围脂质。备选地,有机小孔可以置于较大的固态纳米孔内,诸如可以在氮化硅中制备,且可以定位等离子结构(例如金属结构部分)以使得 MEF 或 SERS 针对有机小孔内的那些分子或部分分子最优化。备选地,有机小孔可以置于等离子结构诸如光子纳米腔内(参见图 5 和 6)。本方法的优点包括单分子被诱导通过所述小孔的充分表征的行为,有机小孔容许的小的和高度可再现的孔径,和生成所述有机小孔的低成本。

[0111] - 使用固态纳米孔容许控制孔径和纳米定位等离子结构,以使得 MEF 或 SERS 最优化。理想地,光子发射可以进一步通过波导手段控制。这将容许更有效的光子检测和更高的检测速度。

[0112] - 第三种一般构建方法容许高度局部化的 EMF 的随机分布,以使得多孔表面上任一给定点的场强是未知的,且容许单分子以受控的速度但不受控的位置通过该表面(图 7)。这具有超越其他两种方法的巨大优势,因为 EMF 或单分子的位置或分布均不精确受控,

可以构建这样的装置的容易性相应较高。以下描述控制在 20nm 小孔和包含随机分布的 EMF 的表面的交叉处的单分子的速度。该方法具有优势,因为其固有是多路的。即使由通过 EMF 的单分子产生的荧光性使得每秒仅可以检测一个分子,但是该装置可以是多路的,从而使数百或千或百万个小孔同时运行。

[0113] 用于构建按照本发明的设备和进行测序的方法

[0114] 按照本发明的设备包括以下:

[0115] - 第一储存器 19,能够容纳数  $\mu\text{L}$  溶液并包含植入其底表面中的电极 26;

[0116] - 具有纳米孔 10 的阵列的硅层(基底)11,其直径 20nm 且间隔  $1\mu\text{m}$  蚀刻在其表面上。电极 12 植入硅层 11 中使得每个直径 20nm 的小孔 10 包含电极 12,且每个电极 12 与具有高斜率的电压源相连(未显示);

[0117] - 与所述硅层结合的多孔膜 22,其上放置有金纳米颗粒 14 的规则阵列。金纳米颗粒 14 具有已知的尺寸和几何形状,且当以合适频率激发时,产生 EMF;

[0118] - 凝胶 24 诸如琼脂糖或聚丙烯酰胺应用于膜 22,所述膜 22 具有这样的平均孔径,即当诱导 ssDNA 20 经由凝胶 22 移动时,其应该采用近似线性构象。这形成本发明实施方案中的控制装置;

[0119] - 在基底 22 的另一侧提供第二储存器 21,分子在运动通过小孔后将进入所述基底 22 中;

[0120] - 具有高斜率的电压调节器的阵列(未显示)与灵敏的光子检测器诸如雪崩光电二极管(未显示)相连;

[0121] - 提供光子检测器诸如雪崩光电二极管(未显示);

[0122] - 提供基于来自光子检测器(未显示)的输入控制电压源阵列的装置;

[0123] - 提供能够在已知尺寸和几何形状的金属胶体(未显示)中诱导等离子共振的频率的激光。

[0124] 进行测序的操作方法

[0125] DNA 通过 PCR 标记,如上所述,从而使给定 ssDNA 链中的两种碱基(C 和 A 或 G 和 T)的全部用荧光标记物进行荧光标记,所述荧光标记物在接近,但优选相对于所用的金属胶体 14 的等离子共振频率略红移处具有最大发射。

[0126] 然后将标记的 ssDNA 置于第一储存器 19 中。将膜 22,其包被有纳米孔凝胶 24 并含有近似平均分布的金纳米颗粒 14 以使得它们之间的间隔在 1nm-100nm 之间随机变化,置于第一储存器 19 上。然后将硅层 11 置于膜 22 上并可以将整个组件浸没在导电溶液中。然后向在 20nm 小孔 10 内的电极 12 提供正电荷,以使得 ssDNA 20 被诱导经由第二储存器 21 移动进入凝胶 24,以线性构象通过凝胶 24 并通过金纳米颗粒 14 阵列,从而在它们通过由等离子共振产生的 EMF 时发射光子。因为在 PCR 反应中使用荧光标记的随机引物,所以第一光子发射应该由 5' 或 3' 引物产生。获自所述引物的光子发射应该直接指示 ssDNA 20 片段可以被诱导经由 EMF 移动且仍获得清晰信号的速度。因为 ssDNA 20 在每个 20nm 的小孔中相对于金球 14 的定位对于每个 ssDNA 片段 20 而言应该不同,所以应该存在能够在任意给定时刻应用于每个小孔 10 的最佳电压。如上概述,包含关于彼此的距离和已知的引物的距离图可以由光子发射数据创建。然后,该数据可以组合为完整的基因组序列。

[0127] 用于制备基底和进行测序的其他方法

[0128] 存在许多可以利用纳米技术生成合适基底的方法。以下描述两种进行测序流程的可能方法和方式。

[0129] 实施例 1- 等离子纳米腔中的有机小孔 (如图 5 和 6 中所示)

[0130] 1) 等离子结构诸如光子纳米腔 30 的阵列由如 [4] 中所述的合适材料 32 构建, 所述纳米腔具有 8-10nm 的内径, 如图 5 中所示, 或具有 4-5nm 的内径, 如图 6 中所示。

[0131] 2) 然后将有机小孔 34 诸如  $\alpha$ -溶血素通过 [13] 中提示的手段定位在这些等离子结构内, 以使得有机小孔 34 间隔约  $1\ \mu\text{m}$ 。

[0132] 3) 然后精确确定这些纳米腔 30 的等离子共振波长并选择激光和荧光染料谱来与所定义的等离子共振相一致。该荧光染料谱应该由等离子共振峰略红移 (20-150meV)。

[0133] 4) 如 [10] 中所述进行经由有机小孔 34 的电解运输。

[0134] 5) 来自荧光标记物的光子发射利用本领域中公知的雪崩光电二极管检测系统来检测。

[0135] 6) 由所选遗传来源提取 DNA 后, 利用 PCR 和随机引物诸如全基因组扩增中使用的那些来荧光标记 ssDNA。PCR 反应中存在的四种核苷酸中, 一种应该仅以其染料-修饰的形式存在, 以确保高密度荧光标记所选核苷酸。为了确保具有长阅读长度的高密度荧光标记, 若干荧光染料可能必须使用如 [7] 中所述的多种聚合酶来测试。

[0136] 7) 然后对剩余三种核苷酸进行该 PCR 反应, 以使得进行四次 PCR 反应, 从而产生包含分别在全部 C, T, G, 和 A 核苷酸处荧光标记的 DNA 的四份样品。

[0137] 8) 在 DNA 即将通过测序装置前, 如本领域中公知地变性 PCR 反应, 以容许标记的 ssDNA 通过纳米孔 34。

[0138] 9) 每次容许一个变性 PCR 反应通过纳米孔 34。

[0139] 10) 来自染料分子的光子发射通过精确到百万分之一秒的 APD 来获得。使用关于 ssDNA 经由小孔移动所已知的来标准化这些光子发射爆发的时刻, 并且创建数千或百万幅距离图以揭示相同核苷酸之间的间隔。

[0140] 11) 然后, 将这些距离图首先组合为相同核苷酸的四个完整的重新装配的序列, 并合成为完整的基因组序列。

[0141] 实施例 2- 合成的纳米孔 (如图 7 中所示)

[0142] 1) 利用本领域中公知的电子束平版印刷术, 在半导体氮化硅或导电金属膜 40 上蚀刻具有 30nm 以下顶端内半径的圆锥形纳米孔阵列。这些纳米孔间隔  $1\ \mu\text{m}$ 。将蚀刻的硅膜安装在如 [11] 中所述的台上, 并置于处于小 Teflon 管 (2mm 直径) 中的电镀液中, 所述小 Teflon 管作为电镀槽运作。包括 1.17% (w/w)  $\text{KAu}(\text{CN})_2$  的 TEMPEREX 8400 (Tanaka Kikinzoku) 在室温下作为电镀液使用。将金丝 (直径 0.5mm) 浸没在溶液中作为对电极。然后将 1.4-1.5V 的偏压应用于与系统相对电极的初始电极。随后将金电镀到所述初始电极表面上。典型地, 0.2mA 的诱导电流容许室温下  $1\ \text{\AA} / \text{秒}$  的电镀速率。

[0143] 2) 然后利用 [11] 中所述的电镀法沉积金层 42, 以生成直径为 1.5-2.5nm 的小孔。当受到适当波长的入射波的激发时, 该结构会产生集中在圆锥形小孔顶端的高度局部化 EMF [12]。

[0144] 3) 当通过电泳诱导标记的 ssDNA 经由小孔 44 移动时, 各种标记物接触到小孔 44 的边缘 43。由于 EMF 在小孔 44 边缘周围高度局部化, 当荧光标记物通过该场时, 应该预测

到光子发射。然而,小孔 44 顶端处的金表面和荧光标记的 ssDNA 之间的接触诱导荧光猝灭。当标记的 ssDNA 继续运动通过小孔顶端并进入通道时,通道扩张。该扩张消除与等离子结构的表面的接触和由此产生的荧光猝灭。

[0145] 4) 然后精确确定这些电镀的圆锥形小孔 44 的等离子共振波长,并选择激光和荧光染料谱以与所定义的等离子共振相一致。该荧光染料谱应该由峰值等离子共振略微红移(20-150meV)。

[0146] 5) 经由圆锥形纳米孔 44 的电解运输如 [8,9] 中所述进行。

[0147] 6) 利用本领域中公知的雪崩光电二极管检测系统检测来自荧光标记物的光子发射。

[0148] 7) 由所选遗传来源提取 DNA 后,利用 PCR 和随机引物诸如全基因组扩增中使用的那些来荧光标记 ssDNA。在 PCR 反应中存在的四种核苷酸中,一种应该仅以其染料-修饰的形式存在,以确保高密度荧光标记所选核苷酸。为了确保具有长阅读长度的高密度标记,若干荧光染料可能必须使用如 [7] 中所述的多种聚合酶来测试。

[0149] 8) 然后对剩余三种核苷酸进行该 PCR 反应,以使得进行四次 PCR 反应,从而产生包含分别在全部 C, T, G, 和 A 核苷酸处荧光标记的 DNA 的四份样品。

[0150] 9) 在 DNA 即将通过测序装置前,如本领域中公知地变性 PCR 反应,以容许标记的 ssDNA 通过纳米孔 44。

[0151] 10) 每次容许一个变性 PCR 反应通过纳米孔 44。

[0152] 11) 来自染料分子的光子发射通过精确到百万分之一秒的 APD 来获得。使用关于 ssDNA 经由小孔移动所已知的来标准化这些光子发射爆发的时刻,并且创建数千或百万幅距离图以揭示相同核苷酸之间的间隔。

[0153] 12) 然后,将这些距离图首先组合为相同核苷酸的四个完整重新装配的序列,并合成为完整的基因组序列。

[0154] 参考文献:

[0155] [1]Fu, Yi, Lakowicz ;Joseph R., " Single molecule studies of enhanced fluorescence on silver island films(银岛膜上的增强荧光性的单分子研究)", Plasmonics(表面等离子体光子学),第 2 卷,第 1 号,2007.

[0156] [2]Nakamura, Toshihiro ;Hayashi, Shinji, " Enhancement of dye fluorescence by gold nanoparticles :Analysis of Particle Size Dependence(通过金纳米颗粒增强染料荧光性:分析颗粒尺寸依赖性)", Japanese Journal of Applied Physics(日本应用物理学杂志),第 44 卷,第 9A 号,第 6833-6837 页,2005.

[0157] [3]Pompa, P.P. 等, " Metal enhanced fluorescence of colloidal nanocrystals with nanoscale control(具有纳米级控制的金属增强的胶体纳米晶体荧光性)", Nature(自然),2006 年 11 月 3 日在线发表.

[0158] [4]Netti, M. Caterina 等, " Confined plasmons in gold photonic nanocavities(金光子纳米腔中的受限等离子)", Advanced Materials(高级材料),第 13 卷,第 18 号,2001.

[0159] [5]Aizpurua, J. 等, Optical properties of gold nanorings(金纳米环的光学性能)", Physics Review Letters(物理学综述书信),第 90 卷,第 5 号,2003.

- [0160] [6]Kucheyev, S. O. 等, " Surface-enhanced Raman scattering on nanoporous( 纳米孔 Au 上的表面 - 增强的拉曼散射)", Applied Physics Letters(应用物理学书信), 卷 89, 2006.
- [0161] [7]Taurai, Tasara 等, " Incorporation of reporter molecule-labelled nucleotides by DNA polymerases. II. High-density labelling of natural DNA(通过 DNA 聚合酶引入报道分子标记的核苷酸. II. 天然 DNA 的高密度标记)", Nucleic Acids Research( 核酸研究), 第 31 卷, 第 10 号, 2003.
- [0162] [8]Heng, J. B. 等, " The Electromechanics of DNA in a synthetic nanopore( 合成的纳米孔中的 DNA 的电力学)", Biophysical Journal( 生物物理杂志), 卷 90, 2006 年 2 月.
- [0163] [9]Ho, Chuen 等, " Electrolytic transport through a synthetic nanometer-diameter Pore( 经由合成的纳米直径小孔的电解运输)", PNAS, 第 102 卷, 第 30 号, 2005.
- [0164] [10]Astier, Yann ; Braha, Orit ; Bayley, Hagan, " Towards single molecule DNA sequencing( 有助于单分子 DNA 测序)", Journal of American Chemical Society( 美国化学学会杂志), 卷 128, 2006.
- [0165] [11]Kashimura, Yoshiaki 等, " Fabrication of nano-gap electrodes using electroplating technique( 利用电镀技术制造纳米 - 间隙电极)", Thin Solid Films( 薄固体膜) 438-439, 2003.
- [0166] [12]Downes, Andrew ; Salter, Donald ; Elfick, Alistair, " Simulations of atomic resolution tip-enhanced optical microscopy( 模拟原子分辨率顶端增强的光学显微镜法)", OPTICS EXPRESS( 光学快讯), 第 14 卷, 第 23 号, 2006.
- [0167] [13]Bayley, Hagan ; Cremer, Paul S., " Stochastic sensors inspired by biology( 受到生物学启示的随机传感器)", NATURE( 自然), 卷 413, 2001 年 9 月.

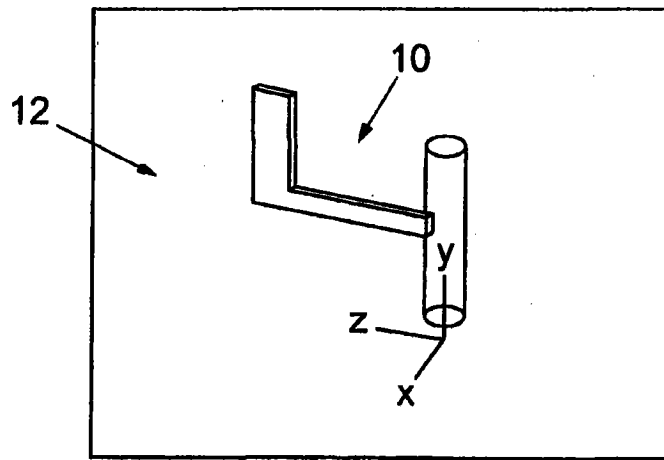


图 1

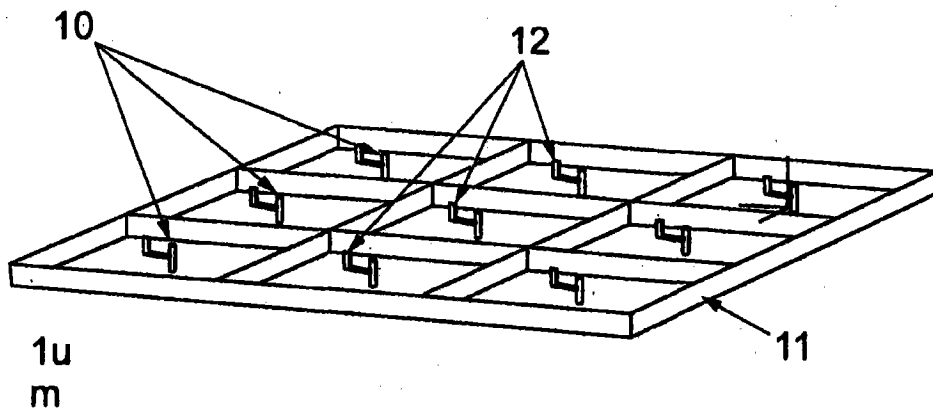


图 2



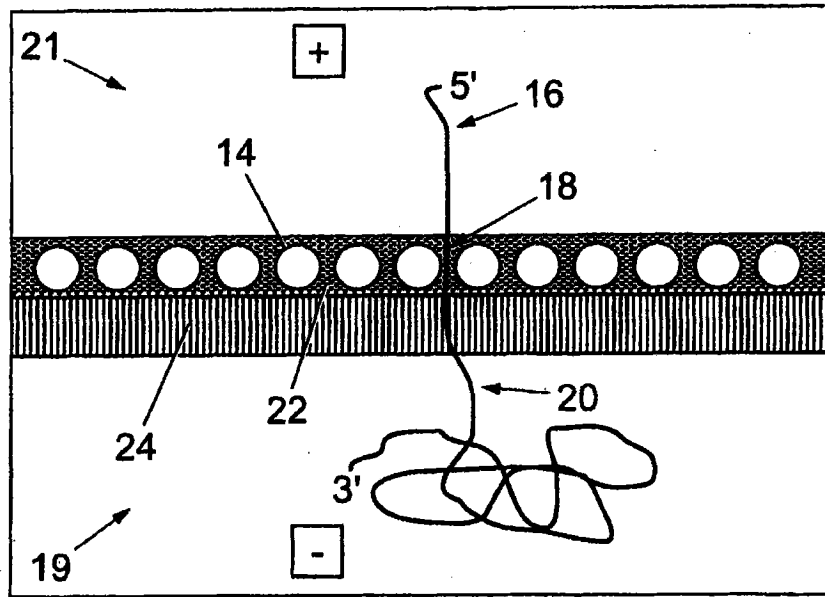


图 3

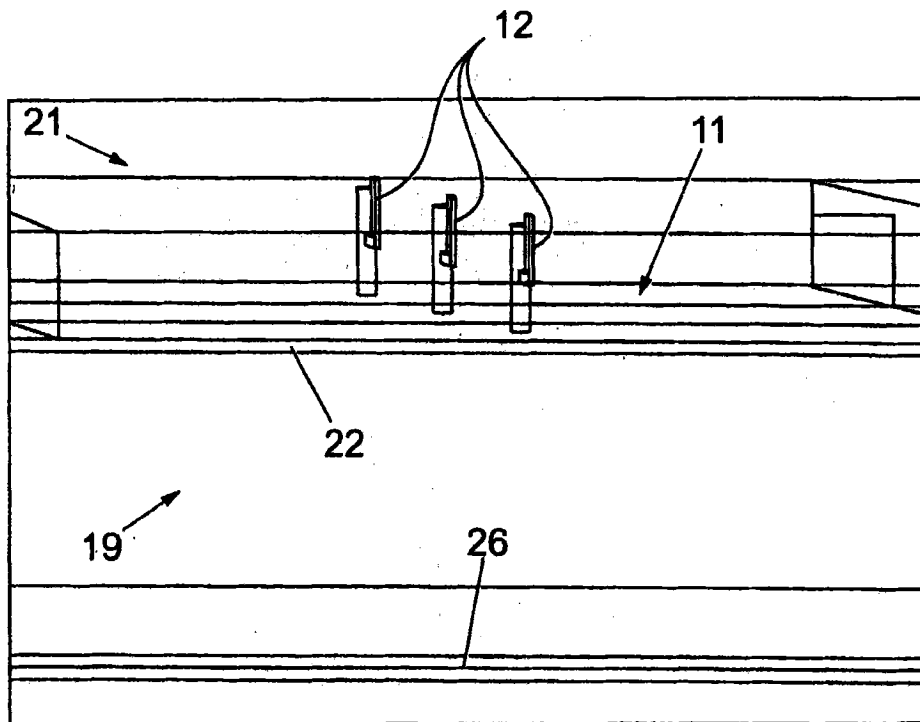


图 4

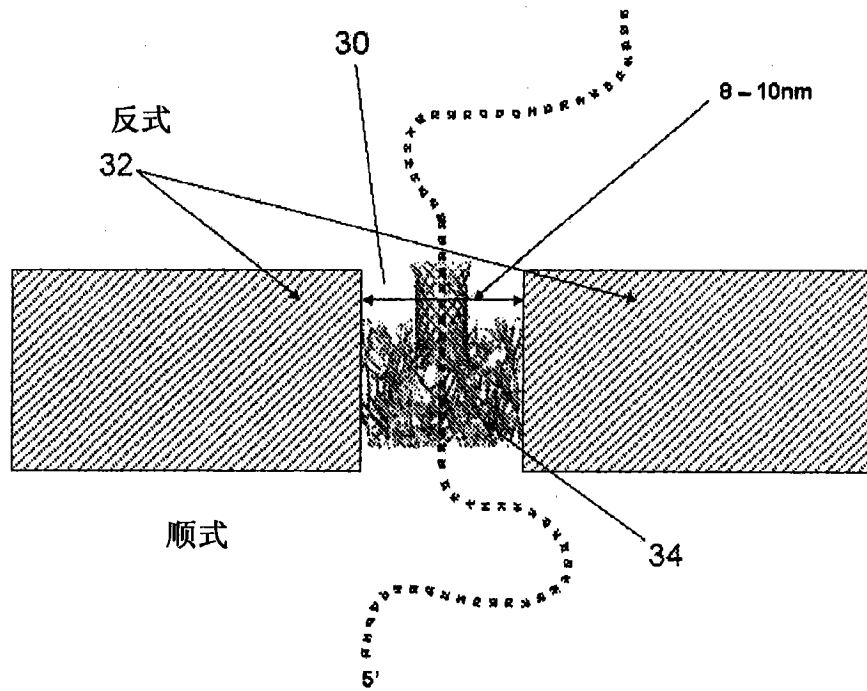


图 5

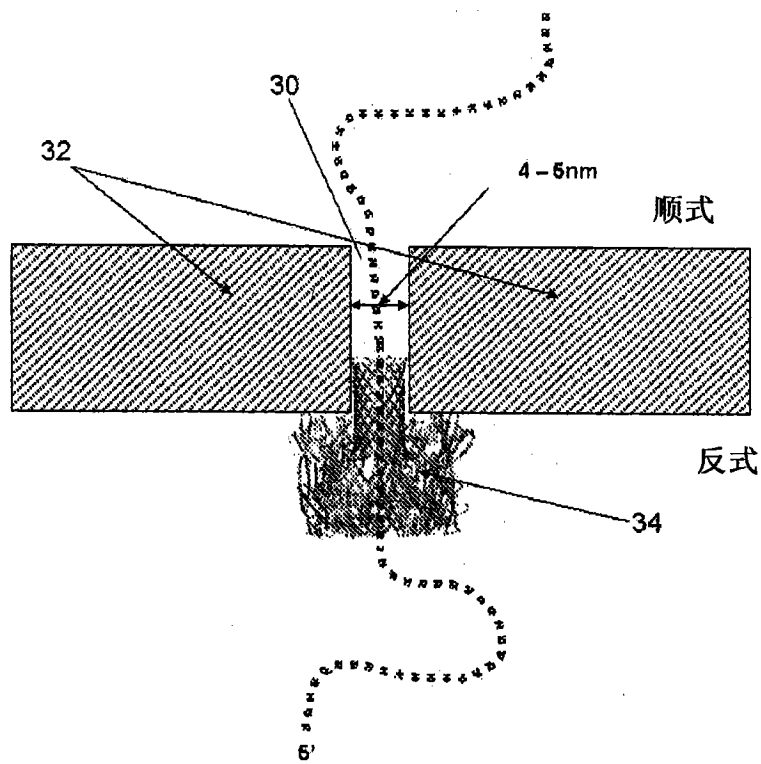


图 6

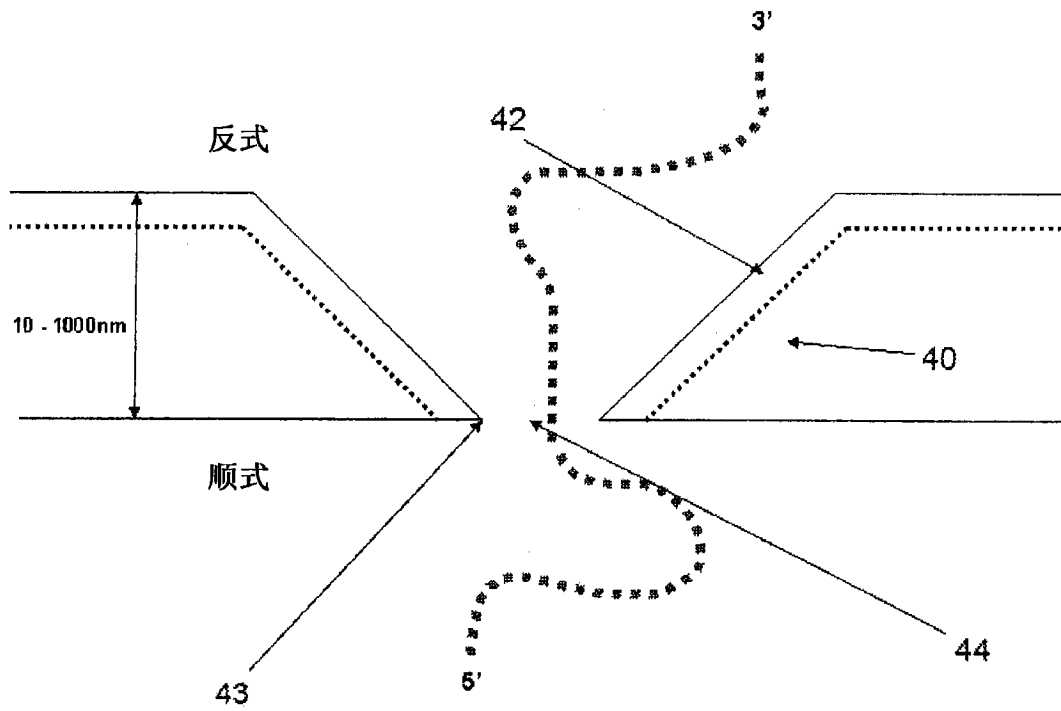


图 7