



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103305402 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310189106. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 03. 28

C12M 1/00 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/908, 582 2007. 03. 28 US

60/908, 584 2007. 03. 28 US

(62) 分案原申请数据

200880017550. 7 2008. 03. 28

(71) 申请人 博纳基因技术有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 曹涵 帕里克希特·A·德什潘德

迈克尔·D·奥斯汀

迈克尔·博伊斯-亚契诺

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 谢丽娜

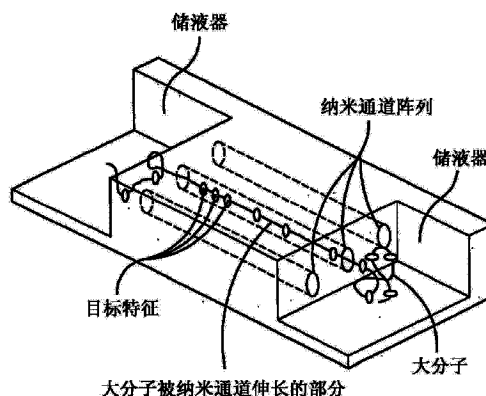
权利要求书2页 说明书16页 附图18页

(54) 发明名称

使用纳米通道阵列的大分子分析方法

(57) 摘要

本发明涉及使用纳米通道阵列的大分子分析方法,具体地,本发明公开了沿着大的基因组 DNA 分子分析特征、例如大分子的物理大小或生物标志物的方法,以及以大批量平行的方式实施这种高通量分析的装置。还公开了制造这样的装置的方法。附图中显示的样品实施方案图示了对流经纳米通道装置的大分子的检测,其中大分子通过纳米通道是使用激发源激发目标部件产生荧光,然后用光子检测装置感应荧光,然后将该荧光信号与大分子的长度相关联来记录的。



1. 一种能够操作单个伸长的大分子的纳米流体装置,包括:

基体,包含表面和一个或多个基本平行于表面布置的流体纳米通道区段,其中至少一个流体纳米通道区段能够容纳并伸长驻留在流体纳米通道区段的至少一部分内的大分子的至少一部分,并且其中每个流体纳米通道区段具有小于大约 1000nm 的横截面直径和至少大约 10nm 的长度;以及

至少一个观察窗,其中观察窗能够允许对一个或多个流体纳米通道区段的至少一部分内含物进行光学检查。

2. 权利要求 1 的装置,包含多个彼此不流体连接的流体纳米通道区段。

3. 权利要求 2 的装置,其中多个流体纳米通道区段基本上平行。

4. 权利要求 1 的装置,包含多个流体纳米通道区段,其中流体纳米通道区段的至少一部分彼此流体连接。

5. 权利要求 4 的装置,其中多个彼此流体连接的流体纳米通道区段布置成分支的样式。

6. 权利要求 1 的装置,其中一个或多个流体纳米通道区段的特征为曲折的形式。

7. 权利要求 1 的装置,其中一个或多个流体纳米通道区段被描述为具有变化的横截面尺寸。

8. 权利要求 1 的装置,其中至少一个流体纳米通道区段包含凸起、膨胀、隆起、柱杆、阻塞,或其任一组合。

9. 权利要求 1 的装置,其中至少一个流体纳米通道区段具有小于大约 200nm 的特征性横截面直径。

10. 权利要求 1 的装置,其中至少一个流体纳米通道区段具有小于大约 50nm 的特征性横截面直径。

11. 权利要求 1 的装置,其中至少一个流体纳米通道区段具有小于大分子回转半径的大约 2 倍的特征性横截面直径。

12. 权利要求 1 的装置,其中至少一个流体纳米通道区段具有至少大约大分子的持久长度的特征性横截面直径。

13. 权利要求 1 的装置,其中至少一个流体纳米通道区段具有至少大约 100nm 的长度。

14. 权利要求 1 的装置,其中流体纳米通道区段以每立方厘米至少 1 个流体纳米通道区段的密度存在。

15. 权利要求 1 的装置,其中观察窗含有狭缝。

16. 权利要求 1 的装置,其中观察窗是可移除的。

17. 权利要求 1 的装置,其中一个或多个流体纳米通道区段的特征为沟槽。

18. 权利要求 17 的装置,还包含能够覆盖至少一个沟槽的至少一部分的盖子。

19. 权利要求 18 的装置,其中盖子是透光的。

20. 权利要求 1 的装置,其中一个或多个流体纳米通道区段的特征为管道。

21. 权利要求 1 的装置,其中一个或多个流体纳米通道的特征为由一个或多个具有表面化学物质的区域分界的区带。

22. 权利要求 21 的装置,其中表面化学物质包括疏水物质、亲水物质、表面活性剂、硫醇、胺、羟基、醇、羰基,或其任一组合。

23. 权利要求 1 的装置,其中大分子是双链 DNA、单链 DNA、RNA,或其任一组合。

24. 检测目标基因组中的拷贝数异常的方法,所述方法包括:

提供包含目标基因组的分离的核酸分子的第一样品;

标记目标基因组的核酸分子的一个或多个区域;

将目标基因组的核酸分子的至少第一区域的至少一部分移位通过基本上平行于基体表面布置的流体纳米通道区段,其中流体纳米通道区段能够容纳核酸区域的至少一部分,并且其中第一个流体纳米通道区段具有小于大约 1000nm 的特征性横截面尺寸和至少大约 10nm 的长度;

捕获对应于目标基因组的第一区域的信号以确定目标基因组的特征性的标记样式;

将目标基因组的标记样式与相应的对照的标记样式进行比较;以及

从所述比较确定目标基因组的核酸分子的至少一个区域的拷贝数。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述对照是目标基因组的第二区域。

26. 权利要求 25 的方法,其还包括确定第一区域和第二区域的拷贝数,然后比较第一区域和第二区域的拷贝数。

27. 权利要求 26 的方法,其中第一区域是与三体连锁的区域,并且第二区域不同于所述三体连锁的区域。

使用纳米通道阵列的大分子分析方法

[0001] 本申请是申请日为 2008 年 3 月 28 日、中国国家申请号为 200880017550.7、发明名称为“使用纳米通道阵列的大分子分析方法”申请的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2007 年 3 月 28 日提交的美国申请 No. 60/908,582 和美国申请 No. 60/908,584 的权益,这些申请的全文在此引为参考。

[0004] 彩色附图

[0005] 本专利文件包含至少一幅彩色制作的图/照片。带有彩色图/照片的本专利的拷贝,将在提出要求和支付必要的费用后由官方提供。

[0006] 政府权利的声明

[0007] 本发明是在美国政府的支持下做出的。按照国立卫生研究院(National Institutes of Health)资助 1R43HG004199-01 下,政府可以在本发明中拥有一定权利。

技术领域

[0008] 本发明的领域包括纳米级的装置,以及制造和使用这样的装置进行大分子分析的方法。本发明的领域还包括多聚核酸的大小和结构分析。

背景技术

[0009] 本文提到了各种不同的科学和专利出版物。每一个都以其全文引为参考。

[0010] 生物分子例如 DNA 或 RNA,是由核苷酸构成的长分子,其线性排序与生物体的基因组和后基因组表达信息直接相关。

[0011] 生物分子例如 DNA 或 RNA,是由核苷酸构成的长分子,其线性序列与生物体的基因组和后基因组表达信息直接相关。

[0012] 许多情况下,在个体的一生中,核苷酸序列的突变或重排导致疾病状态,例如遗传畸变或细胞恶变。在其它情况下,每个个体之间少量的序列差异反映了群体遗传组成的多样性。因此,不同的人具有不同的疾病易感性,或对环境刺激和信号例如压力或药物治疗反应不同。例如,某些患者对某些化合物有阳性反应,而其他人则无效或甚至有不利的副作用。另一个感兴趣的领域是生物分子例如 DNA 对环境毒素或其它有毒刺激例如辐射的反应。有毒刺激可以引起程序化细胞死亡(凋亡),这是一种除去有毒或无功能细胞的过程。凋亡的特征为细胞和核的形态学变化,并常伴随有染色体 DNA 的降解。

[0013] 群体基因组学、比较/进化基因组学、医学基因组学、环境或毒性基因组学,以及研究遗传多样性与医学药理学关系的药物基因组学领域,需要广泛的测序覆盖率和大量样品数量。因此,从这些研究产生的知识,对于保健和制药工业将是特别有价值的。癌症基因组学和诊断学,具体来说研究导致肿瘤发生的基因组不稳定事件。因此,所有这些领域,都将从能够快速测定生物聚合物分子例如核酸上的目标元件/区域的线性序列、结构样式改变,或表观遗传学生物标志物例如沿生物聚合物的甲基化样式的技术中获益。

[0014] 大多数基因组或表观基因组分析技术,对于全面分析大的基因组区域或对于大群

体来说,仍然太繁琐或昂贵。因此,为了实现将基因组分析成本降低至少 4 个数量级、即所谓的“1000 美元基因组”里程碑的目标,需要能够进行直接分子分析方法的新的思维转变的技术。参见 Nicholas Wade 在 2006 年 6 月 18 日的纽约时报《The New York Times》上的文章“寻求 1000 美元人类基因组”(“The Quest for the \$1,000 Human Genome”, by Nicholas Wade, The New York Times, July 18, 2006)。

[0015] 此外,将新的药物引入市场平均要花费 7-10 年时间和 8 亿美元。因此,制药公司正寻求更安全和经济的方式来加速药物的开发,同时使毒性不合格率降到最低。

[0016] 药物化合物毒性可以以基因突变、大规模染色体改变、重组和染色体数目变更的形式导致 DNA 的损伤。基因毒性测试是在细菌、哺乳动物细胞和动物中进行的体外和体内测试,用于检测通过各种不同机制直接或间接诱导这样的损伤的化合物。阳性化合物可能是诱导癌症和 / 或可遗传的缺陷的人类致癌物和 / 或诱变剂。药物的毒性可以是不同水平上的,但是药物诱导的 DNA 诱变,例如种系突变,成为许多长期不利效应的基础。

[0017] 尽管有政府管理机构设置的准则,但药物毒性仍时有发生,包括最近涉及 COX-2 类止痛药的问题。多年来,开发途径中的毒性不合格率仍然未得到改进,造成了该过程不断增加的成本。在化合物筛选过程中,临床前试验包括体外和动物分析,评估功效和潜在的副作用,以预测药剂将如何影响人类,但是这些基因毒性测试所涉及的费用和速度,遏制了更广泛的应用和更早的测试来改进筛选效率。例如,检测诱变性的第一个标准步骤是 Ames 试验,在几乎 30 多年前建立。但即使是 Ames 实验的改进版本,也需要 2-4 天进行处理,每个试验完成要花费 4000 到 5000 美元。因此,Ames 试验通常在药物开发的后期使用。

[0018] 在所需的成套基因毒性测试中,很大一部分是评估染色体的体外或体内损伤,包括使用小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞或人类类淋巴母细胞 TK6 细胞的 tk 基因座,使用 CHO 细胞、V79 细胞或 L5178Y 细胞的 hprt 基因座,或使用 AS52 细胞的 gpt 基因座。毒物学领域利用化合物在这些特定基因座处诱导的突变事件作为整个基因组的代表,希望在这些基因座处诱导的遗传改变将是对基因组全面 DNA 损伤的准确评估,用于模型系统的简化,或仅仅全然缺乏其它有效和经济的评估方式。在理想情况下,每一次化合物的暴露时间、剂量、测试细胞的取样时间或任何测试参数改变,都可以高效和低成本的标准格式,详细评估测试细胞或系统的整个基因组、而不仅仅是几个代表性基因座的损伤信息。至少,能够没有令人止步的价格并且复杂性不增加的情况下,对一组多基因座、例如各来自每个单一染色体或关键的目标区域的每一组进行分析,将是非常有益的。能够允许有效地进行这样的全面泛基因组毒性评估的新的技术平台,将是极度需要的。

[0019] 在 DNA 损伤评估领域,历时几十年的常规细胞遗传学分析(从染色体核型分析、G 带分析到各种形式的 FISH)技术,通常依赖于中期 DNA 的展开,它们的分辨率限制在兆碱基规模。Interface 或 fiber-FISH 方法试图通过使用松弛的或部分伸长的 DNA 来改进分辨率,但是它们仍然难以执行,并且当试图提取定量空间信息时存在挑战。尽管这些技术是强有力的,但因为缺乏一致性和可重复性,它们具有过程控制差的缺点,因此最终受到技术人员技巧的影响,使得它们难以扩大规模,以用于更快速和更廉价的基因毒性测试。

[0020] 其它最近的尝试试图使用表面“梳理”(“combing”)、光学镊子、流体动力学聚焦流动芯片格式来改进个体 DNA 分子的线性化,已反映出对进一步改进分析的一致性、标准化和成本可行性的需要。不幸的是,靶 DNA 伸长方法本来就难以控制,分子的伸长状态往往是

瞬时的、不均匀和不一致的,被视为复杂的分析过程。这种变化性限制了在基因毒性测试中应用这类单分子分析方法进行染色体 DNA 结构损伤的大规模筛选。

[0021] 电泳使用凝胶例如琼脂糖或聚丙烯酰胺,根据它们的不同泳动性,也被用于分离各种分子量的聚合物。在大的聚合物片段的情况下,分离时间可能花费数小时或甚至数天。单细胞电泳分析通常被用于评估由毒性剂例如环境毒素、辐射或化疗中使用的药剂诱导的染色体 DNA 的损伤。在目前基因毒性测试中经常使用的、被称为彗星分析(comet assay)的典型分析中,将细胞在凝胶基体中裂解,然后对 DNA 进行电泳,并用荧光染料染色。在电泳过程中, DNA 片段从细胞中迁移出来,产生彗星尾的样子。彗星尾的几何形状与染色体 DNA 中双链和单链断裂的数量有关,因此为细胞在毒性剂中经历的暴露提供了半定量的度量。尽管该技术对损伤程度提供了评估,但它难以标准化,数据受到解释的影响。此外,染色体 DNA 的片段仍然缠结在一起,不能彼此分辨出来,因此掩盖了关于断裂位置或每个片段的大小的有价值信息。

[0022] 其它基于阵列的方法例如比较基因组杂交(CGH),在检测不平衡的基因组结构改变(扩增,缺失,但不是易位或倒置)中,在克服分辨率问题的某些方面取得了进步,但是受限于比较杂交固有的问题。新一代测序技术旨在以大量平行的读取物相对快速地获得个体遗传分子的序列数据;但是,在这样的技术下分析的分子必须成为相对短的读取物(~ 25 bps)片段,其序列数据经常通过使交叠的读取物最小覆盖的途径而由计算机产生。该方法的缺点是,因为每个个体片段是从整个基因组的范围内取出的,规模通常大得多的总遗传改变往往被掩盖了。在含有大量重复元件区域的复杂基因组和基因拷贝数多态性的情况下,这是特别有关系的。因此,这样的技术缺少提供关于基因组整体、而不是基因组内离散的区域的信息的能力。

[0023] 分子梳理技术在细胞遗传学中具有杠杆的作用,在单个分子水平上产生了更详细的分析。在分子梳理中,当使得液滴在表面上干燥时,通过流体弯液面的后退将 DNA 拉长。在被称为“咖啡染色”效应(Deegan 1997)的现象中,溶质将朝向液滴的边界迁移。在缓冲溶液中的 DNA 情况下, DNA 被随机束缚在液体相边界处的表面上,然后被后退的弯液面的剪切力拉长。不幸的是,这种伸展方法本身不好控制,在不同显微镜载片上的 DNA 样品可能永远不能被一致地“梳理”,没有办法预测分子在表面上的伸展或方位的程度、均匀性。DNA 分子通常彼此交叠,没有完全线性化(因为它们没有物理分离),并且一旦从弯液面释放后,它们的末端通常重新卷回到自身上,留下未完全伸展的 DNA 分子。因此,这种变化性限制了梳理方法应用于大规模的患者筛选。

[0024] 其它试图使用流体生物芯片平台对单个 DNA 分子的线性化进行标准化的尝试,被证明在实现所需的线性化方面相对无效。DNA 经常折回到自身上,甚至保持其游离溶液的高斯(Gaussian)卷曲构象(基本上象线团)。此外,这种技术的分辨率差,因为 DNA 的伸长往往是短暂的、不均匀和不一致的,并且在分析中使用的图像,必须在 DNA 以足够高的速度移动以维持其伸长状态时捕获。此外,因为这些设计是基于单一通道的,流动的分子通过该通道经过光学检测器,因此它们的通量严重受限。

[0025] 因此,对于通过将 DNA 或其它大分子的片段线性化并分析这些分子,来有效确定它们的大小和组成,存在着需求。这样的方法将可以立即使用在诊断和治疗应用中。

[0026] 使用最少量的样品、可能少至单个细胞,将是理想的。这将极大地改进监测细胞状

态、理解疾病的发生和发展例如癌细胞的恶性阶段或导致凋亡的刺激的毒性程度的能力。对于能够执行这样的方法的装置,也存在着相关的需求。

发明内容

[0027] 在面对分析 DNA 片段的大小和组成的挑战中,本发明提供了用于约束、线性化和然后分析这些分子的方法,以及能够执行这些方法的装置。

[0028] 首先提供的是能够操作单个延长的大分子的纳米流体装置,包含:基体,它包含表面和一个或多个基本上平行于表面放置的流体纳米通道区段,其中至少一个流体纳米通道区段能够容纳并伸长驻留在流体纳米通道区段的至少一部分内的大分子的至少一部分,并且其中每个流体纳米通道区段具有小于大约 1000nm 的特征性横截面尺寸和至少大约 10nm 的长度;以及至少一个观察窗,其中观察窗能够允许对一个或多个流体纳米通道区段的至少一部分内含物进行光学检查。

[0029] 还提供了使用纳米流体装置表征一种或多种大分子的方法,包括将大分子的至少一个区域的至少一部分移位通过基本上平行于基体表面放置的流体纳米通道区段,其中流体纳米通道区段能够容纳并伸长大分子的区域的至少一部分,并且其中流体纳米通道区段具有小于大约 1000nm 的特征性横截面尺寸和至少大约 10nm 的长度;以及通过能够允许对流体纳米通道区段的至少一部分内含物进行光学检查的观察窗,监测与大分子的一个或多个区域移位通过纳米通道相关的一种或多种信号;以及将监测到的信号与大分子的一种或多种特性相关联。

[0030] 还提供了装置,包括装置 A,它包含:基体,它包含表面和一个或多个基本上平行于表面放置的流体纳米通道区段,其中至少一个流体纳米通道区段能够容纳并伸长驻留在所述流体纳米通道区段的至少一部分内的大分子的至少一部分,并且其中每个流体纳米通道区段具有小于大约 1000nm 的特征性横截面尺寸和至少大约 10nm 的长度;并且其中至少一个流体纳米通道区段的至少一部分被一个或多个激发源照明。

[0031] 此外还公开了大分子分析装置,包含一个或多个放置在表面上的纳米通道,一个或多个纳米通道具有小于大约 1000nm 的宽度,并且一个或多个纳米通道由一个或多个边界界定并能够制约大分子的至少一部分,以便将大分子的该部分维持在线性形式。

[0032] 还提供了分析大分子的方法,包括将一种或多种大分子放置在表面上,该表面具有一个或多个能够制约大分子的至少一部分的纳米通道,以便将大分子的该部分维持在线性形式;令一种或多种大分子经受驱动力,以便伸长一个或多个纳米通道内一种或多种大分子的至少一部分;以及监测从一种或多种大分子发出的一种或多种信号。

[0033] 本发明还讲述了制造大分子分析装置的方法,包括通过安排两个或多个边界在表面上界定一个或多个纳米通道,一个或多个边界能够制约大分子,和一个或多个纳米通道具有小于大约 1000nm 的宽度。

附图说明

[0034] 当结合附图一起阅读时,将进一步理解概要以及下面的详细描述。出于说明本发明的目的,在图中显示了本发明的示例性实施方案;但是,本发明不限于所公开的具体方法、组成和装置。此外,图不一定是按比例绘制的。在图中:

[0035] 图 1A 示出了流过纳米通道装置的大分子的检测,其中大分子通过纳米通道是使用激发源激发目标部件产生荧光,然后用光子检测装置感应荧光,然后将该荧光信号与大分子的长度相关联来记录的;

[0036] 图 1B 示出了装置的横截面图,其中来自激发源的光在它们通过光子检测器下方时照射目标部件,其中检测器又监测被照射的部件发射的任何光子;

[0037] 图 2A 示出了流过纳米通道装置的大分子的检测,由此使大分子暴露于通过狭缝的激发光照,其中荧光信号通过将大分子流过纳米通道,从狭缝下方纳米通道中的大分子区域获取,可以从狭缝收集荧光信号流,可用于确定沿着大分子的长度的特征性特点,如图 2B 中所示;

[0038] 图 3 示出了使用狭缝从流过纳米通道的大分子获取的荧光信号如何能够产生数据流;

[0039] 图 3A 描绘了当分子沿着通道流动时的荧光信号,和使用数据分析算法,可以确定大分子的数量和它们的长度;

[0040] 图 3B 示出了荧光信号强度对图 3A 中大分子从狭缝旁经过的时间的作图,图 3D 示出了荧光信号强度对图 3C 中大分子从狭缝经过的时间的作图——在两种情况下,都可以从检测到的信号确定关于大分子大小分布的信息;

[0041] 图 4A 示出了流过纳米通道装置的大分子的例子,由此使大分子暴露于聚焦于纳米通道的确定区域上的激发光照——在这样的实施方案中,荧光信号从纳米通道中大分子被照射的区域获取,并通过将大分子流过被照射的区域,从大分子收集荧光信号流,图 4B,可用于确定沿着大分子的长度的特征性特点;

[0042] 图 5A 示出了流过纳米通道装置的大分子,由此使大分子暴露于与芯片装置整合在一起的激发光源——在该实施方案中,荧光信号从纳米通道中大分子被照射的区域获取,并通过将大分子流过被照射的区域,从大分子收集荧光信号流,图 5B,可用于确定沿着大分子的长度的特征性特点;

[0043] 图 6A 示出了大分子流入纳米通道装置并被至少部分伸长的例子,纳米通道装置中纳米通道被盖子覆盖——在伸长后,大分子粘附于表面,取下盖子,参见图 6B,暴露出大分子伸长的区域,使大分子伸长的区域可用于其它的分析、加工、处理等;

[0044] 图 7 示出了分支的纳米通道网络,其中每个纳米通道与一个或多个纳米通道相连——当大分子流过网络时,大分子的伸长程度是纳米通道横截面尺寸的函数,对于流过三个连续的纳米通道的大分子例子来说,由于它们的横截面直径不相同($D_3 > D_2 > D_1$),大分子伸长的程度也将不同($L_3 < L_2 < L_1$),同样地,大分子上目标部件之间的距离将以可测量 (scalable) 的方式变化 ($T_3 < T_2 < T_1$);

[0045] 图 8A 示出了穿过多个流体纳米通道区段的标记大分子,其中区段以栅格状样式布置,其中 DNA 在穿过区段时被伸长——图 8B 描绘了穿过非线性流体纳米通道区段的标记大分子;

[0046] 图 9 显示了在纳米沟槽中伸长的 DNA 分子(图 9A),其中沟槽的边界由表面的拓朴学样式确定;以及(图 9B)纳米轨道或纳米径,其中轨道的边界由表面性质的变化确定;

[0047] 图 10 显示了在纳米通道装置中伸长的大分子,其中盖子的材料,可透过在大分子驻留在纳米通道内时能够与大分子相互作用的试剂,——这样的可透过盖子,也可用于用

试剂预处理纳米通道,以便在大分子一旦进入预处理过的纳米通道后,试剂与大分子相互作用;

[0048] 图 11 显示了纳米通道网络的各种构象,并描绘了其中纳米通道彼此之间流体连接以及纳米通道彼此平行布置的网络;

[0049] 图 12A 显示了各种大小的 DNA 片段。

[0050] 图 12B 是图 12A 中加框的 DNA 片段的特写图。

[0051] 图 12C 描绘了图像强度作为图 12A 和 12B 中加框的 DNA 片段的位置函数。

[0052] 图 13A 描绘了几种长度各不相同的标记 DNA 片段;

[0053] 图 13B 描绘了图像强度作为图 13A 中 DNA 片段的位置的函数;

[0054] 图 14 描绘了本公开的纳米通道装置和方法的两种应用——图 14 的左手边图描绘了使用纳米通道装置表征大分子群,其中性质可以包括群内分子大小的分布,或某些生物标志物在组中的浓度,图 14 的右手边图描绘了使用纳米通道装置表征单个分子,包括单个分子的大小和生物标志物在单个分子上的空间位置;

[0055] 图 15 是代表性的纳米通道装置的示意图,其中(A)表示样品入口,(B)表示装置上布置的纳米通道,(C)表示用于接受流过纳米通道的样品的废液区,和(D)表示能够与纳米通道装置外部的其它装置、仪器等形成电或其它连接的结构;

[0056] 图 16 是与塑料机壳配合的纳米通道装置的示意图,塑料机壳含有一个或多个排列的接口,以便将纳米通道装置与装置外部的其它装置连接——图 16 还提供了纳米通道阵列的示意图,其中纳米通道与微流体以及一组柱状物相连,其中柱状物能够在在大分子进入纳米通道之前将一种或多种大分子至少部分拉直;

[0057] 图 17 和 18 是在具有带电和不带电区域的表面上形成的图样的显微照片,带电区域用指示剂粉末标记;以及

[0058] 图 19 描绘了纳米通道阵列,其中大分子包括用于在大分子的入口或进口处固定大分子的珠子——珠子的大小可以阻塞纳米通道的入口。

具体实施方式

[0059] 通过参考下面的详细描述并结合构成本公开的一部分的附图和实施例,可以更容易地理解本发明。应该理解,本发明不限于本文描述和/或显示的具体的装置、方法、应用、条件或参数,在本文中使用的术语是为了描述只作为例子的具体实施方案,并不打算对要求保护的发明进行限制。此外,当在说明书包括权利要求书中使用时,没有数量的指代形式包括复数,对具体数值的指称至少包括该特定值,除非上下文明确表示不是如此。本文中使用的术语“多个”,是指超过一个。当表示值的范围时,另一个实施方案包括从一个具体值和/或到另一个具体值。同样地,当值用先行词“大约”表示成近似值时,应该理解具体的值构成了另一个实施方案。所有的范围都是包含性的和可组合的。

[0060] 应该理解,本发明的某些特点,为了清楚起见,在本文中描述在分开的实施方案内容中,但它们也可以组合提供在单个实施方案中。相反,本发明的各种不同特点,为了简便起见描述在单个实施方案内容中,也可以独立或以任何子组合提供。此外,对范围中陈述的进行陈述的值的指称,包含了该范围内每个和所有的值。

[0061] 术语

[0062] 本文中使用的术语“通道”是指由边界界定的区域。这样的边界可以是物理的、电学的、化学的、磁性的,等等。术语“纳米通道”被用于表明某些通道在某些尺寸上被认为是纳米级的。

[0063] 本文中使用的术语“生物分子”是指 DNA、RNA、蛋白和其它生物来源的分子。

[0064] 直径小于 200nm 的纳米通道,已显示能够线性化双链 DNA 分子,从而防止分子自身折回,并完全排除了在自由溶液中通常假定的天然高斯卷曲构型(Cao 等, APL, 2002a)。这种构型约束是单分子 DNA 分析的理想工具(Cao 等, APL, 2002b)。纳米通道已显示能够常规线性化大小在几百千碱基到兆碱基范围的片段(Tegenfeldt 等, PNAS, 2004)。此外,纳米级环境中流体流的本性排除了湍流和许多剪切力,否则它们将使长的 DNA 分子成为片段。这对于大分子线性分析来说是特别有价值的,特别是在使用特异性探针或感兴趣的非特异性条形码标记模式和特征例如 CpG 岛簇的表观遗传学生物标志物,对基因组结构样式变化的分子分析中。

[0065] 这些有利的特征进一步打开了大范围线性测序应用的可能性,在该应用中使用了完整的天然 DNA,不用片段化或亚克隆。此外,对于读取物长度或容量没有限制,因为平行或交织的纳米通道可以被制造成长达 30cm 长,密度超过每 cm 数以万计的通道。更重要的是,在通过控制良好的制造或自体装配途径制成的封闭的或未封闭的纳米通道中,捕获和线性化聚合物例如基因组 DNA 将最终允许在单分子水平上进行高度理想标准化的定量测量聚合物。

[0066] 纳米通道与纳米孔的区别在于纳米孔具有非常低的纵横比(长度 / 直径),而纳米通道具有高纵横比。典型情况下,纳米孔的直径为 0.5 到 100nm,但是长度仅仅为几纳米。纳米通道可以具有相似的直径,但是长度至少为 10nm。

[0067] 纳米通道的有效直径由回转半径和要分析的聚合物的持久长度(persistence length)决定,以便确保聚合物在纳米通道内的部分完全或接近完全线性化。半柔性的聚合物链在自由溶液中捆扎成随机卷曲,回转半径被定义为 $R_g = (Lp/6)^{1/2}$,其中 L 是计算的伸直长度, p 是聚合物链的持久长度。长度为 16.5 微米、并含有大约 500 持久长度的 λ -DNA 片段,其回转半径为大约 734nm。Chen 等, Probing Single DNA Molecule Transport Using Fabricated Nanopores (使用制造的纳米孔探测单个 DNA 分子运输), Nano Letters, 2004, 4, 11, 2293-2298。4681 个碱基对的双链 DNA 片段的回转半径为大约 280nm。Dietrich 等, Advances in the Development of a Novel Method to be used in Proteomics using Gold Nanobeads(使用金纳米珠开发用于蛋白质组学的新方法的进展), Ultrasensitive and Single-Molecule Detection Technologies (《超灵敏的和单分子检测技术》), Jorg Enderlein 等主编, Proc. of SPIE Vol. 6092, 6092C(2006)。因此,纳米通道的直径可以小于被分析的聚合物卷曲回转半径的两倍。这种尺寸的纳米通道开始在自由波动的聚合物卷曲上执行熵约束(entropic confinement),使它伸长和 / 或线性化。

[0068] 生物分子例如 DNA 或 RNA 片段是长的聚合物,它们的大小通常携带有在非均质生物样品中未知的重要信息。电泳使用凝胶例如琼脂糖或聚丙烯酰胺,通常被用于根据不同的泳动性来分离各种分子量的聚合物。在大的聚合物片段的情况下,分离时间可能要花费数小时或甚至数天。出于本申请的目的,生物分子例如 DNA、RNA、蛋白或其它单个分子,被称为大分子。

[0069] 上面描述的尺寸足够小的长纳米通道,通过熵约束有效地将这些聚合物链伸长成线性形式,赋予了它们与它们的个体分子量定量相关的表观伸直长度。

[0070] 这对于应用例如基因毒性——确定由特定化合物造成的遗传损伤——来说是特别重要的,其中一个或多个关键的染色体 DNA 片段的大小和序列,携带有与凋亡的阶段和暴露于毒性刺激的水平相关的重要信息。基因毒性测试在制药学中特别重要,参见 1997 年关于人类使用药物注册的技术要求协调的国际大会的《工业 S2B 基因毒性准则:用于制药学基因毒性测试的一组标准》(Guidance For Industry S2B Genotoxicity:A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals,International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use,1997)。在上述报告中可以看到,推荐制药学中的基因毒性测试包括(1)细菌中的基因突变试验;(2)使用哺乳动物细胞进行染色体损伤的细胞遗传学评估的体外试验,或体外小鼠淋巴瘤 tk 分析测试;以及(3)使用啮齿动物造血细胞进行的染色体损伤体内试验。因此,有效执行基因毒性测试的方法对于制药工业将立即具有实用性。

[0071] 确定 DNA 片段的大小能够提供进一步的信息,例如由所述刺激直接或间接引起的因子在哪里与长的聚合物相互作用;或在与特定条件相关的特定位置处损伤将发生在哪里。已经报道,在凋亡过程中,染色体 DNA 首先被消化成大小为 50-300kpbs 的片段。随后的消化步骤产生小于 1kbp 的片段(Nagata 等,Cell Death and Diff.2003)。

[0072] 在毒性基因组学领域中,单细胞电泳分析通常用于评估由毒性剂例如环境毒素、辐射或化疗中使用的药剂诱导的染色体 DNA 的损伤。在被称为彗星分析的典型的分析方法中,将细胞在凝胶基质中裂解,然后对 DNA 进行电泳,并用荧光染料染色。

[0073] 在电泳过程中,DNA 片段从细胞中迁移出来,产生了所谓的彗星尾形状。彗星尾的几何形状与染色体 DNA 中双链和单链断裂的数量相关,因此为细胞经历毒性剂暴露提供了半定量的度量。尽管该技术在定义上提供了单细胞分析,但它难以标准化,并且数据易受解释的影响。此外,染色体 DNA 的片段仍然缠结在一起,不能彼此分辨出来,因此掩盖了关于断裂的位置或各片段大小的信息。

[0074] 最后,由辐射引起的 DNA 损伤的评估是另一个重要领域。除了意外暴露于各种不同形式的辐射之外,所有癌症患者中超过一半在某个时间接受了放射疗法。确定正确的辐射剂量以最小化副作用,同时保持杀死肿瘤的最大疗效,是一种挑战。典型的放射治疗计划为期 30 天;但是,在当前的实践中,治疗计划基本上从一开始就根据来自对“平均”患者的所谓最佳治疗数据设置了,可能并不适合于每个个体。在放射肿瘤学领域中,发现新的诊断和治疗方法,以朝着个体化医学优化放射疗法,具有高度的领先性。

[0075] 在分子水平上,放射治疗主要通过断裂 DNA 来杀死肿瘤细胞。以可能给予医生有价值的反馈的方式检测这种遗传损伤,可以帮助调整随后的治疗。在当前的放射剂量学测定中,暴露后的基因组损伤评估和细胞生存力的分析,常常以相对繁琐和缓慢的方式进行,不能获得在肿瘤内部或健康细胞周围正发生什么的直接定量信息。

[0076] 当应用于放射疗法时,基于纳米通道阵列的装置,可以将基因组 DNA 样品从它们的天然卷曲结构解开成线性的形式,并分析群体特征例如碎裂成片段的损伤程度。这种方法可以监测从肿瘤和周围组织获取的 DNA 样品的完整性的变化,并以即刻的方式定量损伤,以使用“函数性”肿瘤信息更好地指导治疗。

[0077] 一方面,本发明提供了能够操作单个伸长的大分子的纳米流体装置,包括:基体,它包括表面和一个或多个基本上平行于表面放置的流体纳米通道区段,其中至少一个流体纳米通道区段能够容纳并伸长驻留在流体纳米通道区段的至少一部分中的大分子的至少一部分,并且其中每个流体纳米通道区段具有小于大约 1000nm 的特征性横截面尺寸和至少大约 10nm 的长度;以及至少一个观察窗,其中所述观察窗能够允许对一个或多个流体纳米通道区段的至少一部分内含物进行光学检查。

[0078] 在某些实施方案中,如图 11 中所示,流体纳米通道区段彼此不流体连接,在某些情况下可以基本上彼此平行布置。

[0079] 在其它实施方案中,也如图 11 中所示,流体纳米通道区段的至少一部分是彼此流体连接的。在这些实施方案的某些中,彼此流体连接的流体纳米通道区段布置成分支样式或栅格样式。微通道的某些样式可以通过本技术领域的专业人员已知的自组装技术来获得。

[0080] 在某些情况下,一个或多个流体纳米通道区段可以是弯曲的形式、曲折的形式,或甚至具有变化的横截面积。考虑了不是所有的纳米通道的横截面尺寸都是相同的,在某些情况下,至少一个流体纳米通道区段所占的横截面尺寸不同于其它流体纳米通道区段的横截面尺寸。

[0081] 参见图 11,还考虑了纳米通道区段可以是互相连接的,或甚至横截面是变化的。

[0082] 适合于本发明的基体包括金属、陶瓷、聚合物、玻璃、硅、半导体、塑料、电介质、SiGe、GaAs、ITO、熔融二氧化硅等。最适的基体将由用户的需要决定。

[0083] 适合的流体纳米通道区段的特征性横截面尺寸小于大约 500nm,或小于大约 200nm,或小于大约 100nm,或甚至小于大约 50nm、大约 10nm、大约 5nm、大约 2nm,或甚至小于大约 0.5nm。

[0084] 流体纳米通道区段适合具有的特征性横截面尺寸小于大分子回转半径的大约两倍。在某些情况下,纳米通道具有的特征性横截面尺寸为至少大约大分子的持久长度。

[0085] 适合于本发明的流体纳米通道区段的长度为至少大约 100nm,至少大约 500nm,至少大约 1000nm,至少大约 2 微米,至少大约 5 微米,至少大约 10 微米,至少大约 1mm,或甚至至少大约 10mm。在某些实施方案中,流体纳米通道区段以每立方厘米至少 1 个流体纳米通道区段的密度存在。

[0086] 本发明的观察窗可以包含狭缝、孔眼、方格或其任一组合。在某些构型中,观察窗是可移除的、或可通透的,参见图 10。可通透的窗适合能够使一个或多个流体纳米通道区段的内含物与流体纳米通道区段外部的环境流体连通。

[0087] 如图 9A 和 9B 中所示,流体纳米通道区段的特征可以为沟槽,某些装置包含了能够覆盖至少一个沟槽的至少一部分的盖子。参见图 6。在某些实施方案中,盖子的至少一部分,可透过能够与驻留在流体纳米通道区段中的大分子相互作用的可溶性分析物,图 10,或者是可移除的或甚至透光的。在某些实施方案中,一种或多种大分子在流体纳米通道区段中是至少部分伸长的,并且在取下盖子后保持基本上伸长的形式。参见图 6B。

[0088] 在其它实施方案中,图 1,流体纳米通道区段特征为管道,在某些情况下,特征为一个或多个具有表面化学物质的区域分界的区带。参见图 9B。适合的表面化学物质包括疏水物质、亲水物质、表面活性剂、硫醇、胺、羟基、醇、羰基、硅烷等。其它的表面化学物质在本文

别处描述。

[0089] 考虑了一个或多个流体纳米通道区段与一个或多个流体装置流体连通,所述流体装置例如导管、泵、过滤器、筛网、阻塞(occlusions)、凝胶、加热器、分流器、储液器等。

[0090] 适合在装置中使用的大分子包括聚合物、双链 DNA、单链 DNA、RNA、多肽、生物分子、蛋白等。适合的聚合物包括同聚物、共聚物、嵌段共聚物、无规共聚物、分支共聚物、树枝状聚合物,或其任一组合。

[0091] 在某些实施方案中,本装置包括能够将装置与装置外部的一个或多个仪器流体连通的一个或多个连接器;适合的仪器包括泵、导管、过滤器、筛网、凝胶、加热器、阻塞、分流器、储液器,或其任一组合。

[0092] 还公开了使用纳米流体装置对一种或多种大分子进行表征的方法,包括:将大分子的至少一个区域的至少一部分移位通过基本上平行于基体表面布置的流体纳米通道区段,其中流体纳米通道区段能够容纳并伸长大分子的区域的至少一部分,并且其中流体纳米通道区段具有小于大约 1000nm 的特征性横截面尺寸和至少大约 10nm 的长度;以及通过能够允许对流体纳米通道区段的至少一部分内含物进行光学检查的观察窗,监测与大分子的一个或多个区域移位通过纳米通道相关的一种或多种信号;以及将监测到的信号与大分子的一种或多种特性相关联。

[0093] 所要求保护的方法还包括将至少一种生物实体暴露于目标剂、这些剂的代谢物、所述剂的盐等。所述剂包括染料、标记物、蛋白、酶、探针、核苷酸、寡核苷酸以及类似的物类。

[0094] 暴露是通过注射、处理、分散、转染、消化、浸泡、流过或施加所述剂来完成的。例如,可以将细胞在含有染料剂的介质中温育一段时间,以便将细胞暴露于该剂。

[0095] 适合进行所要求保护的生物实体不限于细胞;这样的实体还可以包括生物体、生物分子、蛋白等。这样的实体的组分也可以是需要保护的实体。

[0096] 在某些实施方案中,方法还包括从生物实体分离一种或多种大分子。分离可以通过本技术领域的普通专业人员已知的手段来完成。这类手段的非限制性列举包括例如提取、裂解、纯化、拉下、操作、反应、蒸馏、电泳等。

[0097] 多种大分子适合用于所要求保护的方法。这些大分子的一些包括蛋白、单链 DNA、双链 DNA、RNA、siRNA 等。聚合物以及其它链结构的分子也适合用于所要求保护的方法。

[0098] 在方法中使用的大分子也可以将一种或多种大分子分割成两段或多段。在某些情况下,这能够更有效地加工或储存大分子。

[0099] 大分子的分割通过发射激光、超声处理、化学处理、物理操作、生物学处理、裂解、限制等来实现。本技术领域的普通专业人员将会认识到适合分割或分段或缩短给定大分子的方法。

[0100] 方法还包括将荧光标记物、放射活性标记物、磁性标记物或其任一组合结合到大分子的一个或多个区域上。当标记物与大分子或大分子的至少一部分或其它目标区域特异性互补时,可以实现结合。

[0101] 移位包括施加流体流、磁场、电场、放射活性场、机械力、电渗力、电泳力、动电力、温度梯度、压力梯度、表面性质梯度、毛细管流,或其任一组合。考虑了移位包括将大分子的至少一部分可控地移动到流体纳米通道区段的至少一部分中;以受控的速度和受控的方向

将大分子的至少一部分移动通过流体纳米通道区段的至少一部分。

[0102] 监测包括显示、分析、作图或其任一组合。监测信号的方式对于本技术领域的普通专业人员来说是明了的。

[0103] 一种或多种监测信号包括光信号、辐射信号、荧光信号、电信号、磁信号、化学信号,或其任一组合。

[0104] 在某些实施方案中,信号由电子自旋共振分子、荧光分子、化学发光分子、放射性同位素、酶底物、生物素分子、亲和素分子、电荷转移分子、半导体纳米晶体、半导体纳米粒子、胶体金纳米晶体、配体、微珠、磁珠、顺磁性颗粒、量子点、生色底物、亲和性分子、蛋白、肽、核酸、碳水化合物、抗原、半抗原、抗体、抗体片段、脂质或其任一组合产生。

[0105] 在某些实施方案中,分子是未标记的,并通过红外光谱术、紫外光谱术或其任一组合监测。

[0106] 信号通过使用一种或多种激发源诱导荧光、化学发光、磷光、生物发光或其任一组合来产生。适合的激发源包括激光、可见光源、红外光源、紫外光源或其任一组合。

[0107] 关联包括通过在流体纳米通道区段中部分或完全伸长大分子,从大分子群体中确定不同的大分子或其部分的特点。在某些实施方案中,大分子的至少一部分在监测过程中是静止的。

[0108] 考虑了在某些情况下,大分子的至少一部分在流体纳米通道区段的至少一部分内被移位一次以上。这样的移位允许多次分析给定大分子的同区域。

[0109] 关联适合包括测定大分子的至少一部分的长度,测定大分子的至少一部分当约束于一个或多个流体纳米通道区段内时的表观部分伸长长度。表观部分伸长长度,被测定为沿着其中约束了部分伸长的大分子的流体纳米通道区段的线性距离。考虑了关联还包括确定大分子的一种或多种组分的身份,或测定大分子的一种或多种组分的序列,或确定大分子的至少一部分上一种或多种修饰的存在,或其任一组合。

[0110] 关联通过自动化手段、计算机化手段、机械手段、人工手段,或其任一组合来进行。关联包括根据通过纳米通道的检测区观察到的信号调制,表征双链体核酸分子的一种或多种算法,其中所述算法存在于计算机可读介质中。

[0111] 考虑了大分子的一种或多种特征是存在于大分子的至少一部分上的一种或多种靶特点。适合的靶特点包括表观遗传学因子,例如甲基化样式。

[0112] 靶特点还包括一种或多种基因组结构,包括一个或多个特定分子序列的位置、SNPs、单元型、重复元件、拷贝数多态性, DNA 分子上一个或多个基因座中的改变、开放阅读框、内含子、外显子、调控元件,或其任一组合。靶特点还包括化合物 / 药物结合位点 / 复合物, DNA 修复或裂解结合位点 / 复合物, siRNA 或反义核苷酸结合位点 / 复合物, 转录 / 调控因子结合位点 / 复合物, 限制性酶结合 / 裂解位点 / 复合物, 或任何其它遗传工程或化学修饰结合位点 / 复合物, 或其任一组合。

[0113] 在某些实施方案中,本发明可以进一步包括将大分子与已知长度 L1 的第一种标记探针相接触,其中第一种标记探针与拷贝数已知的对照基因组序列互补,以及将大分子与已知长度 L2 的第二种标记探针相接触,其中第二种标记探针特异性针对目标核苷酸序列;将大分子导入流体纳米通道区段的至少一部分中;将标记的大分子在流体纳米通道区段内伸长;检测第一个标记探针与基因组对照序列之间、以及第二个标记探针与目标核苷

酸序列之间的结合；以及确定对应于第一个标记探针(S1)和第二个标记探针(S2)的杂交信号的总长度。

[0114] 本发明的方法还包括计算目标核苷酸序列的拷贝数。拷贝数通过计算比率 $N1=S1/L1$ 与 $N2=S2/L2$ 来计算,其中N1对应于基因组对照序列的拷贝数,N2对应于目标核苷酸序列的拷贝数。考虑了对照序列的拷贝数是整数,并且N2与N1之间的差异指示了被分析的基因组中的畸变。

[0115] 方法还考虑了对照基因组序列包括分离的部分,它们在每个基因组上的总长度是已知的,其中目标序列包括分离的部分,它们在每个正常基因上的长度是已知的,其中N2与N1之间的显著差异表明基因组中的遗传畸变。

[0116] 在某些实施方案中,目标核苷酸序列可以与三体连锁的染色体相关,其中对照基因组序列来自三体连锁的染色体之外的染色体,其中 $N2/N1$ 比率为大约1.5指示了三体基因型。在其它实施方案中,目标核苷酸序列包含一部分基因组的缺失。在其它实施方案中,目标核苷酸序列包含重复序列。

[0117] 在某些方面,本方法包括了实施方案,其中对照基因组序列和目标核苷酸序列对于给定基因组来说是相同的,其中在一个或多个流体纳米通道区段内分析了一个或多个不同的基因组,以便确定每个基因组存在的相应量。

[0118] 预期 $N2/N1$ 比率的统计学误差小于20%。

[0119] 进一步考虑了所述方法包括下述实施方案,其中对照基因组序列和目标核苷酸序列来自同一基因组,或甚至其中对照基因组序列与目标核苷酸序列来自同一染色体。

[0120] 本方法可以进一步包括所谓的侧翼探针,标记样品核苷酸在目标核苷酸区域任何一端的区域,以及对照核苷酸在目标核苷酸区域任何一端的区域。在这样的实施方案中,方法包括(a)将标记的核苷酸导入分别的流体纳米通道区段中,这些流体纳米通道区段的横截面直径足以至少基本伸长标记的核苷酸,(b)分别确定样品核苷酸和对照核苷酸上标记物之间的距离,以及重复步骤(a)和(b)一次或多次,使得样品和对照核苷酸进一步线性化,以便当核苷酸伸长时获得关于对照和样品核苷酸上标记物之间的距离的进一步信息。

[0121] 这些实施方案进一步包括通过比较对照和样品核苷酸上标记物之间的距离,来确定样品核苷酸上目标区域的长度,其中对照和样品核苷酸上标记物之间的距离之间的差异,表明了样品核苷酸上目标区域中的畸变。

[0122] 还提供了装置,包括:基体,它包括表面和一个或多个基本上平行于表面布置的流体纳米通道区段,其中流体纳米通道区段的至少一个能够容纳并伸长驻留在流体纳米通道区段的至少一部分内的大分子的至少一部分,并且其中每个流体纳米通道区段具有小于大约1000nm的特征性横截面尺寸和至少大约10nm的长度;并且其中至少一个流体纳米通道区段的至少一部分被一个或多个激发源照明。

[0123] 适合的流体纳米通道区段及其样式和尺寸在本文中别处描述。适合的基体也在本文别处描述。

[0124] 考虑了在某些实施方案中,本发明的装置包括布置于被照明的流体纳米通道区段与照明源之间的观察窗,其中观察窗包含狭缝,并且在某些实施方案中是可移除的。还考虑了观察窗能够使一个或多个流体纳米通道区段的内含物与流体纳米通道区段外部的环境流体连通。

[0125] 纳米通道区段特征为沟槽,其中沟槽描述在本文的别处。适合覆盖这样的沟槽的盖子也描述在本文别处,并考虑了一种或多种大分子在流体纳米通道区段中是至少部分伸长的,并且在取下盖子后保持在基本上伸长的形式。

[0126] 流体纳米通道还特征为一个或多个具有表面化学物质的区域分界的区带,其中流体纳米通道描述在本文别处。

[0127] 一个或多个流体纳米通道区段与一个或多个适合的流体装置流体连通,流体装置描述在本文别处,包括筛网、阻塞、凝胶、加热器、分流器、储液器,或其任一组合。

[0128] 在某些实施方案中,装置包含位于一个或多个纳米通道附近的一个或多个障碍物。这样的障碍物可以帮助展开或解开大分子,以增强大分子进入纳米通道的能力。

[0129] 适合用于本发明的大分子描述在本文别处。正如别处描述的,装置可以包括一个或多个连接器,能够将装置与装置外部的一个或多个仪器流体连通。适合的仪器描述在本文别处。

[0130] 适合用于装置激发源包括激光、卤素灯、汞灯、红外光源、紫外光源、二极管、波导管、放射源,或其任一组合。装置还包括能够透射激发源光的光谱的滤光片。

[0131] 被一个或多个激发源照射的至少一个被照射的流体纳米通道区段的部分,其特征为是一个或多个狭缝,一个或多个圆形点、椭圆形、多边形,或其任一组合。

[0132] 适合的激发源能够扫描过至少一个流体纳米通道区段的至少一部分。在某些实施方案中,装置包含一个或多个激发源。

[0133] 装置适合包括检测器,检测器的放置使得能够接收从一个或多个被照射的流体纳米通道区段内部产生的光学信号。

[0134] 适合的检测器包括电荷耦合器件(CCD)检测系统,互补金属氧化物半导体(CMOS)检测系统,发光二极管监测系统,光电倍增管检测系统,闪烁检测系统,光子计数检测系统,电子自旋共振检测系统,荧光检测系统,光子检测系统,电检测系统,照相底片检测系统,化学发光检测系统,酶检测系统,原子力显微镜(AFM)检测系统,扫描隧道显微镜(STM)检测系统,扫描电子显微镜(SEM)检测系统,光学检测系统,核磁共振(NMR)检测系统,近场检测系统,全内反射(TIR)检测系统,膜片钳检测系统,电容检测系统,或其任一组合。

[0135] 还公开了大分子分析装置。公开的装置包括一个或多个布置在表面上的纳米通道,所述一个或多个纳米通道具有小于大约 1000nm 的宽度,并且一个或多个纳米通道由一个或多个边界界定并能够约束大分子的至少一部分,以便将大分子的该部分维持在线性形式。

[0136] 纳米通道的适合长度在大约 10nm 到大约 10cm 的范围内,或大约 100nm 到大约 1cm。尽管纳米通道可以是直的、平行的、互相连接的、弯曲的或曲折的,本发明的纳米通道适合包含至少一个基本上直的部分,其长度为大约 10nm 到大约 100cm,或在大约 100nm 到大约 10cm 的范围内,或甚至为大约 1mm 到大约 1cm。例如,所要求保护的发明包括其中纳米通道以往返的、辐射体类型的样式排列在表面上的实施方案。

[0137] 纳米通道的宽度适合小于 1000nm,或小于 500nm,或小于 50nm。在某些实施方案中,纳米通道的宽度适合小于大约 10nm,或甚至小于大约 5nm。

[0138] 正如讨论,本发明的两个或多个纳米通道可以是相互连接的。根据用户的需要,纳米通道可以具有恒定的横截面,或者横截面可以变化。

[0139] 界定本发明的纳米通道的边界具有各种不同的构造。边界可以适合是物理壁、脊等。或者,边界包括带电荷区域、化学处理过的区域、磁场区域等。疏水性和亲水性区域被认为是特别适合边界。在某些情况下,边界由不同的材料形成,例如玻璃、塑料、聚合物或金属的条。在其它实施方案中,边界由自装配的单层(SAMs)形成。在其它实施方案中,纳米通道是相反的结构,其中暴露的表面界定了纳米通道的边界,通道的中央路径在性质上不同于暴露的分界面。纳米通道适合能够约束大分子的至少一部分,以便伸长或展开大分子的该部分。例如,亲水性的大分子可以通过放置或布置在由疏水性边界分界的纳米通道中来伸长。在该实施例中,大分子将被边界约束,并将变得伸长。

[0140] 适合用于本公开的装置的表面包括玻璃、陶瓷、硅、金属、聚合物任一组合等。表面将按照用户的需要进行选择,并且这对于本技术领域的普通专业人员是显而易见的,某些表面可以将在这样的表面上界定边界区域所需的各种化学或其它处理方法进行优化修改。

[0141] 所要求保护的装置还包括布置在至少一个纳米通道的至少一部分的上方的观察窗。这样的观察窗可以透过一种或多种大分子。例如,观察窗可以包括一个或多个孔、洞、通道或纳米通道,其中任何一个都将能够使大分子以三个维度在所要求保护的装置中移动。这样的三维构型允许大分子以多个方向导入和按路线行进,并且在某些实施方案中,能够在所要求保护的装置中同时观察大分子的多个区域。

[0142] 公开的发明还包括检测器。这样的检测器适合能够监测或捕获从所要求保护的装置内的分子产生的信号;其中检测器包括 CCD 相机或光子计数装置。

[0143] 所要求保护的发明还提供了分析大分子的方法。方法包括将一种或多种大分子布置在表面上,该表面具有一个或多个能够约束大分子的至少一部分的纳米通道,以便将大分子的该部分维持在线性形式,对一种或多种大分子施加驱动力,以便伸长一个或多个纳米通道内一种或多种大分子的至少一部分,以及监测从一种或多种大分子产生的一种或多种信号。

[0144] 大分子适合通过包括分散、滴注、流动等布置在表面上。大分子适合被携带在流体中,例如水、缓冲液等中,以帮助它们定位在表面上。载体流体按照用户的需要进行选择,适合的载体流体对于本技术领域的普通专业人员来说是已知的。

[0145] 在某些实施方案中,一种或多种大分子至少部分位于一个或多个纳米通道内。

[0146] 适合的驱动力包括压力梯度、磁场、电场、后退性弯液面、表面张力、热梯度、拉力、推力等。其它向大分子施加力的方式对于本技术领域的普通专业人员来说是已知的,其方式包括光学阱、光学镊子、物理探针、原子力显微镜等。驱动力可以是恒定的、可变的、交替的,驱动力的频率和强度将取决于用户的需要。

[0147] 在某些实施方案中,一种或多种大分子束缚在表面上用于分析。束缚可以通过生物素-亲和素键合,通过金与巯基之间的相互作用,或通过抗体-抗原或抗体-表位相互作用来实现。本技术领域的普通专业人员用户将会认识到将分子束缚于表面的适当方式。

[0148] 在其它实施方案中,大分子通过动力至少部分固定化。例如,大分子可以在一端包含珠子,其中珠子的直径大于特定纳米通道的横截面。向这样的大分子施加流体流,将导致大分子的珠子卡在纳米通道的一端,从而将伸展到纳米通道的至少一部分中的大分子固定化。在这样的实施方案中,可以通过施加相反的驱动力,例如通过逆转流体流场的方向,将大分子从纳米通道释放。磁场和电场也适合用于将大分子固定化在纳米通道中,其中场容

易逆转以释放这些固定化的大分子。通过这样的方式,给定的纳米通道组可以多次重复用于分析给定的大分子,或被再循环,以分析不同的大分子或大分子组。

[0149] 监测从大分子产生的信号通过尤其是记录、作图或显示信号来完成;适合情况下,监测到的信号适合源自于大分子在纳米通道中基本上线性形式的部分。监测可以通过观察窗或通过直接质询一种或多种大分子来进行。

[0150] 公开的方法还包括分析一种或多种产生的信号,其中分析适合包括将一种或多种监测到的信号与一种或多种大分子的一种或多种特性相关联。关联可以包括例如将特定信号的存在与 DNA 区段上特定突变的存在相关联。

[0151] 还提供了制造大分子分析装置的方法。这些方法包括通过布置两个或多个边界,在表面上界定一个或多个纳米通道,其中一个或多个边界能够约束大分子,并且一个或多个纳米通道具有小于大约 1000nm 的宽度。

[0152] 本方法形成的纳米通道可以具有小于 500nm、小于 100nm、小于 50nm 或甚至小于 10nm 的宽度。纳米通道的最适宽度将由用户的需要和所研究的大分子来决定。

[0153] 边界的布置,由特别是赋予至少一部分表面以电荷、赋予至少一部分表面疏水性、赋予至少一部分表面亲水性、赋予至少一部分表面磁性或其任一组合来实现。在一个实施方案中,布置是通过将至少一部分表面与具有表面轮廓的模具相接触来实现,该模具含有与边界或纳米通道的所需样式互补的表面轮廓。适合于本发明的模具包含一个或多个纳米级的部件,可以通过本技术领域的专业人员已知的方法来制造。

[0154] 一个示例性的实施方案显示在图 9B 中,该图显示了由表面 B——它可以是疏水性表面——的边界和表面 A 的路径界定的纳米通道或纳米径,其中表面可以是亲水性的或其它与表面 B 不同的表面。类似的边界也可以用于界定纳米通道的更复杂的样式,例如在图 7 中显示的。

[0155] 例如,模具或其它含有纳米通道的基体可以与疏水性化合物相接触。然后将模具与亲水性表面相接触,在表面上留下疏水性斑纹作为边界,在表面上界定与模具上的纳米通道样式相对应的纳米通道。模具或其它样式也可用于影响电荷或磁场区域。这通过尤其是将模具与带电荷物质、疏水性物质、亲水性物质、磁性物质、铁磁性物质或其任一组合相接触来实现。示例性的样式显示在图 17 和 18 中,其中通过将电荷区域布置在基体上,并将与带电荷区域结合的指示物粉末铺在基体上并移除未结合的粉末,从而突出那些带电荷的区域,来产生样式。

[0156] 实施例和其它说明性实施方案

[0157] 一般程序。通过使用以不同角度倾斜的样品晶片进行溅射、CVD、电子束蒸发,提供覆盖材料的沉积。该步骤用于减小纳米通道的直径和提供盖子。

[0158] 在大多数情况下,将 100-340nm 的 SiO_2 沉积在通道开口上。有效的密封使用测试过的各种沉积条件来实现。在气体压力 30mTorr、RF 功率~900W 和 DC 偏磁 1400V 下,获得了~9nm/min 的沉积速率。在 5mTorr 的较低压力下,沉积速率估计增加到 17nm/min。填充材料通过在 5mTorr 下溅射来沉积到纳米通道开口上。关于制造纳米通道阵列和装置的进一步详细情况,可以在美国专利申请公布 Nos. US 2004-0033515 A1 和 US 2004-0197843 A1 中找到,它们每个在此以其全文引为参考。

[0159] 实施例 1:提供了具有多个平行的线性通道的硅基体,通道具有 100nm 的沟槽宽度

和 100nm 的沟槽高度。这些通道的开口按照上面给出的一般程序在 5mTorr 的气体压力下溅射。溅射沉积时间是 10-25 分钟, 以提供从不完全密封到完全密封的纳米通道阵列。二氧化硅通过电子束(热)蒸发器(Temescal BJD-1800)沉积在基体上。基体放置成二氧化硅源靶发出的沉积束的各种入射角; 沉积速率可以设置为大约 3nm/ 分钟, 150nm 的密封材料在大约 50 分钟内沉积。密封材料的入射沉积束的角度可以变化, 以减小通道的宽度和高度分别到小于 150nm 和 150nm, 和通过提供浅切线沉积角度减小而基本上密封。

[0160] 实施例 2: 在本实施例中, 将纳米通道阵列与表面修饰剂相接触。按照实施例 1 制造的纳米通道阵列可以在真空仓室部浸泡在含有聚乙二醇的表面修饰剂溶液中, 以便于润湿和处理通道, 并除去可能捕获在纳米通道内部的空气气泡。

[0161] 实施例 3: 本实施例描述了如何为微通道阵列提供样品储液器, 以提供纳米流体芯片。按照实施例 1 的一般程序制备了具有 100nm 宽、100nm 深的纳米通道的纳米通道阵列。将纳米通道阵列用光阻材料旋涂, 并使用光掩模进行构图像, 以在通道阵列的相反末端提供区域。暴露的区域使用反应性离子蚀刻进行蚀刻, 以暴露出纳米通道末端, 并在基体边缘处通道的相反末端上提供大约毫米宽的微米深的储液器。

[0162] 实施例 4: 本实施例描述了如何用含有 DNA 大分子的流体填充纳米流体芯片, 以分析 DNA。将直径 2mm 的圆柱形样品投送塑料管, 放置成与实施例 3 的纳米通道阵列的储液器之一流体连通。投送管与外部的样品投送 / 收集装置相连, 该装置又与压力 / 真空产生器相连。使用缓冲溶液利用毛细管作用润湿纳米通道。将含有染色例如 λ 噬菌体大分子(λ DNA) 的缓冲溶液通过电场 (1-50V/cm) 导入纳米通道阵列; 溶液的浓度为 0.05-5 微克 / mL, λ DNA 使用染料 TOTO-1 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) 以 10:1 的碱基对 / 染料的比例进行染色。将该染色的 DNA 溶液, 在含有 0.1M 抗氧化剂和作为抗粘附剂的 0.1% 线性聚丙烯酰胺的 0.5xTBE (tris- 溴乙酸缓冲液, pH7.0) 中, 稀释到 0.01-0.05 微克 / mL。

[0163] 实施例 5: 本实施例描述了如何对纳米通道中线性化的大分子的 DNA 全部或显著部分进行成像。将 DNA 大分子荧光标记, 并按照实施例 4 中讨论的程序流入到纳米通道中。将激发光源例如 100W 卤素灯通过 60X 透镜聚焦在纳米通道上, 由此激发视野中的 DNA 分子。通过透镜收集从 TOTO-1 染料分子发出的荧光, 通过二色性滤光器反射, 并穿过允许 TOTO-1 发射的波长谱带透射的滤光器。使用 CCD 相机检测光, 从而在视野中产生 DNA 分子的图像。

[0164] 实施例 6: 本实施例描述了如何在 DNA 大分子通过检测区时检测它们, 其中检测区小于在纳米通道中线性化的 DNA 分子的端到端的物理长度。按照实施例 4 中的描述染色 DNA 并将其流入纳米通道。检测区通过界定激发光可以通过的狭缝来限制。使用沉积在纳米通道顶部上的 100nm 铝薄膜, 然后使用光蚀刻术和氯等离子体蚀刻, 在铝中开出 1 微米的狭缝, 来限定该狭缝。当 DNA 通过铝狭缝下的纳米通道部分时, 它暴露于激发光, 并发射荧光。荧光发射按照实施例 5 中的描述收集, 但是使用光电倍增管(PMT)检测。PMT 记录信号, 直到 DNA 分子完全通过狭缝。通过将 DNA 移动通过狭缝的速度(典型为 1-100 微米 / 秒)与检测到信号的时间长度相关联, 确定了 DNA 分子的大小。

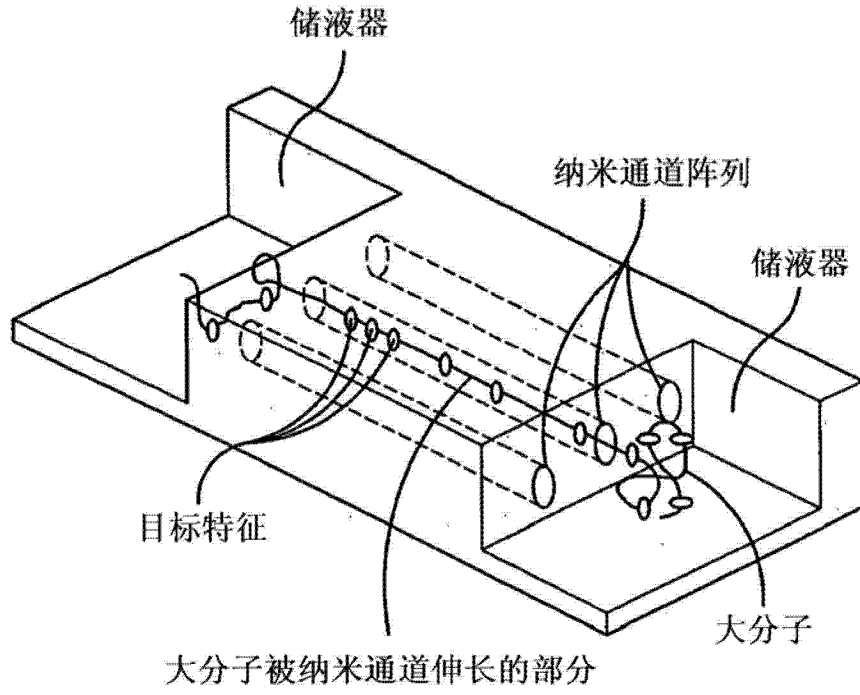


图 1A

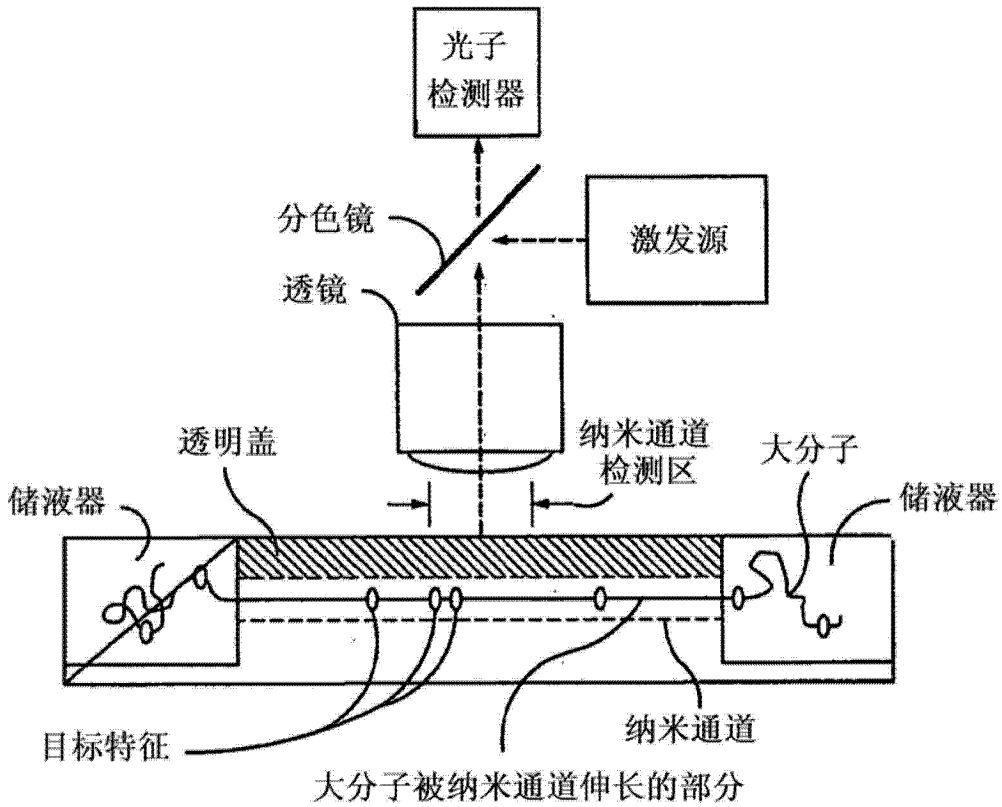


图 1B

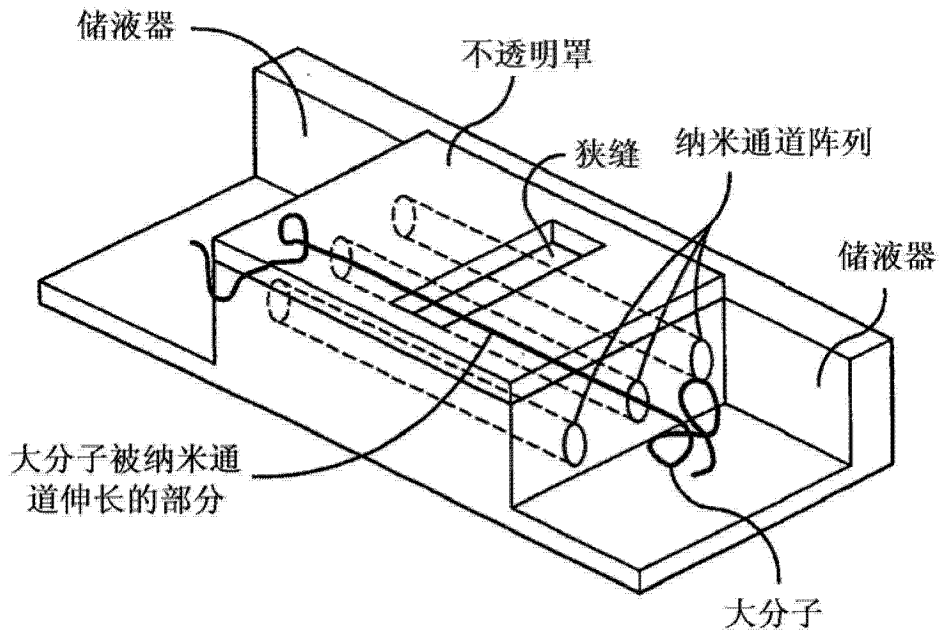


图 2A

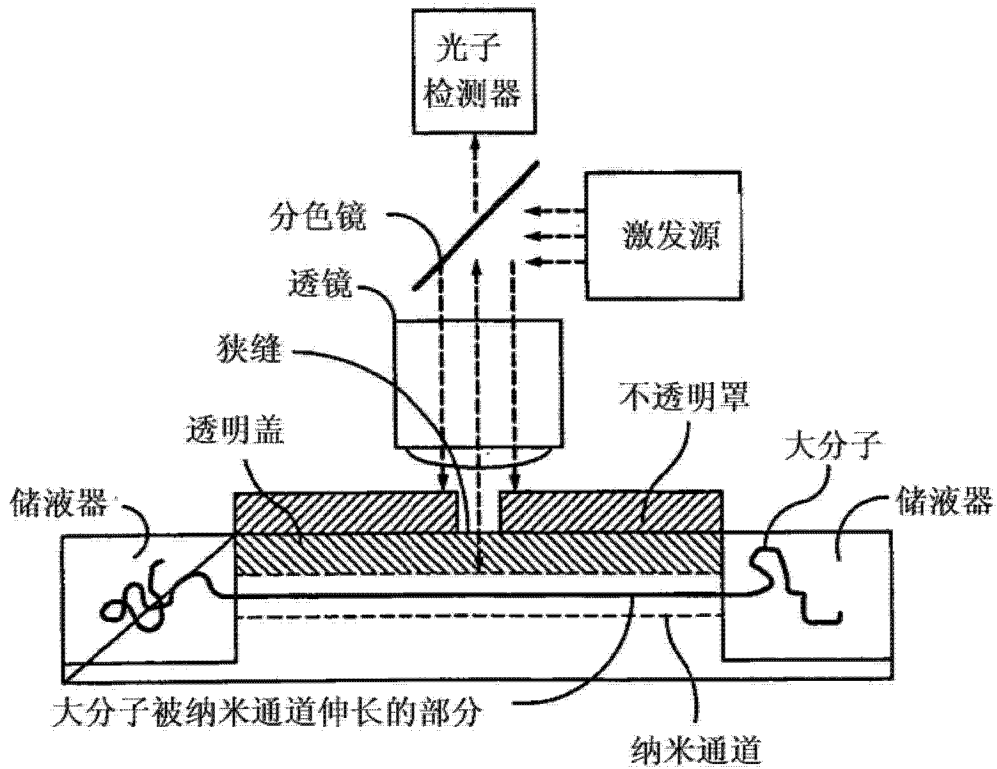


图 2B

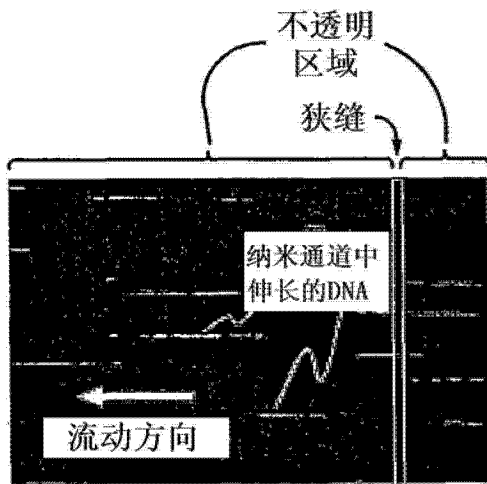


图3A

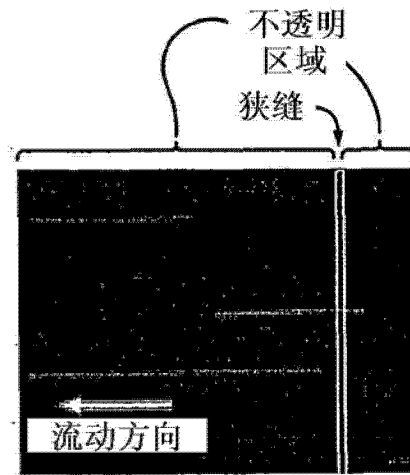


图3C

从狭缝收集的荧光信号的信号强度（任意单位）

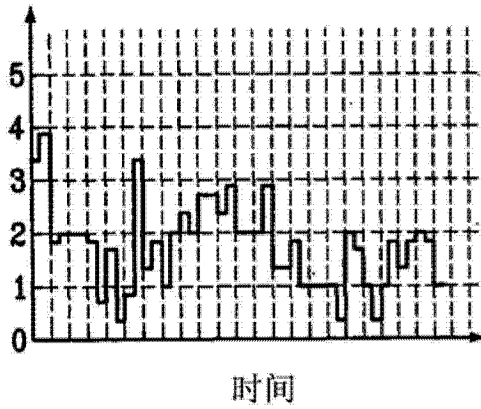


图3B

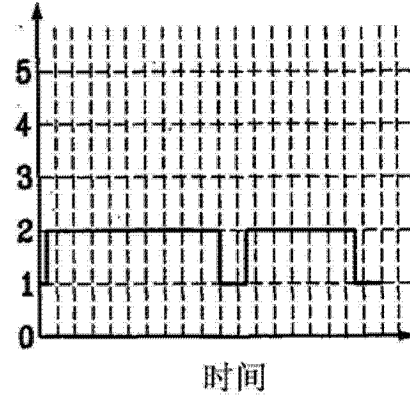


图3D

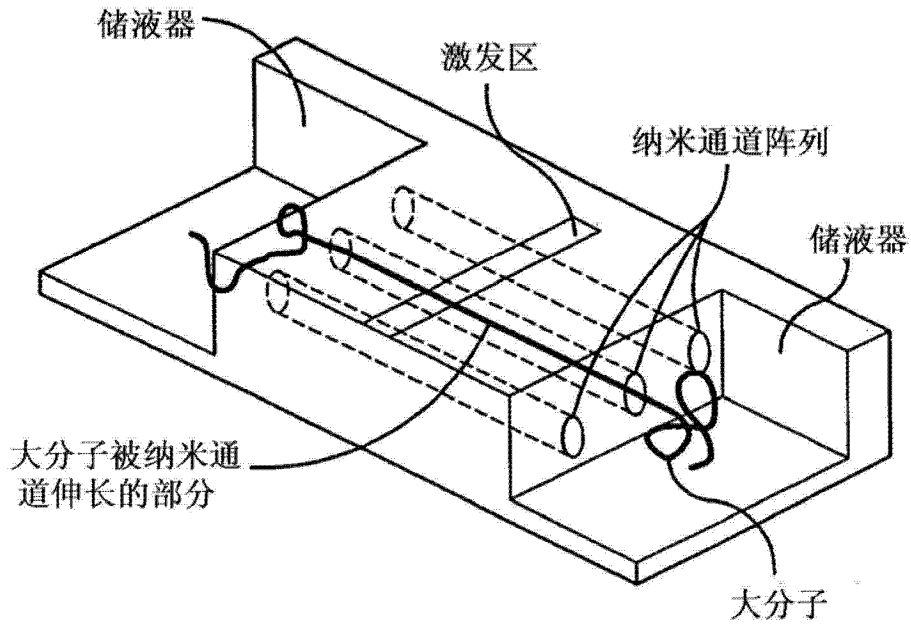


图 4A

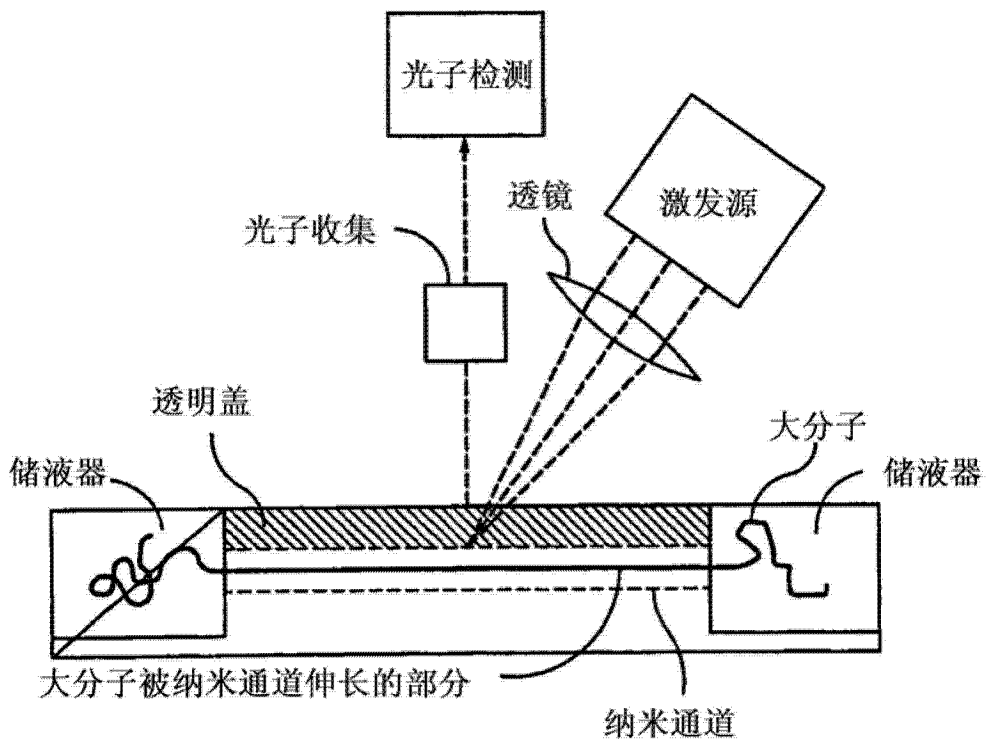


图 4B

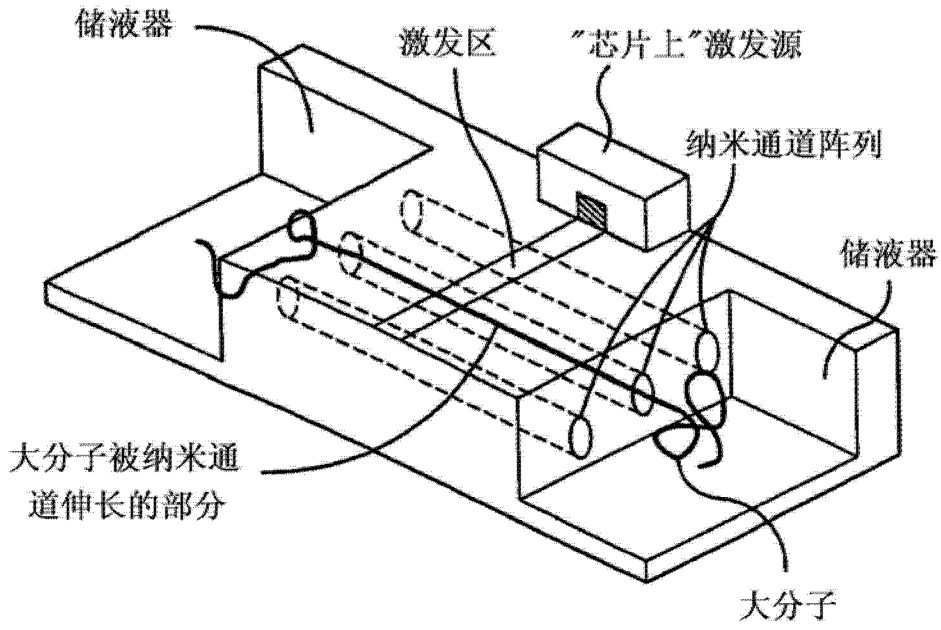


图 5A

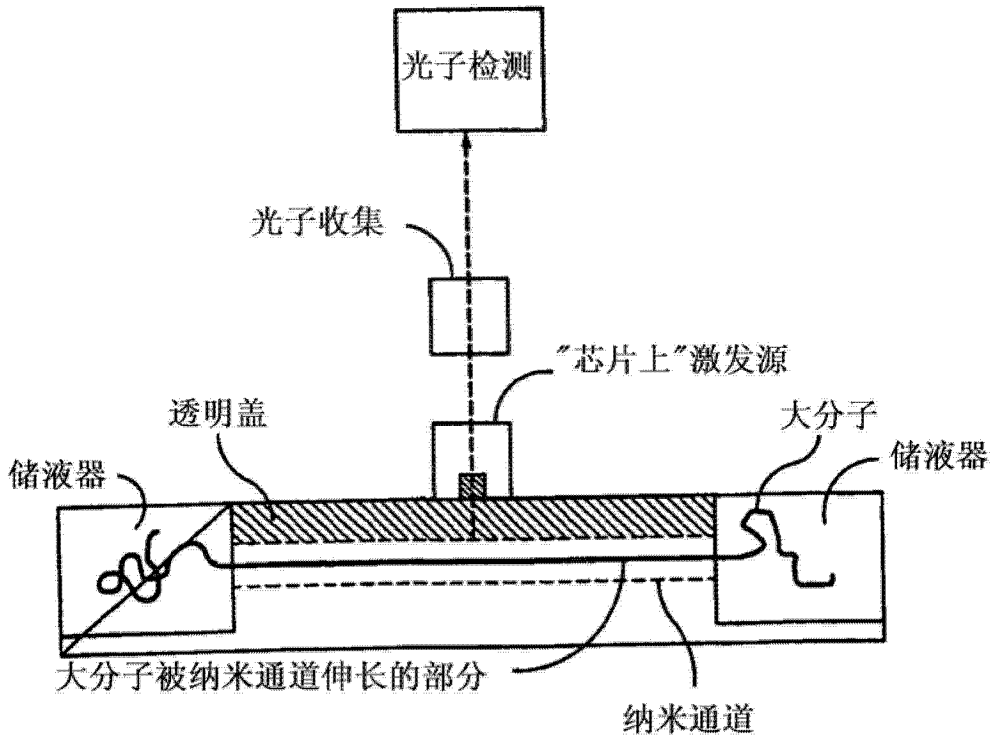


图 5B

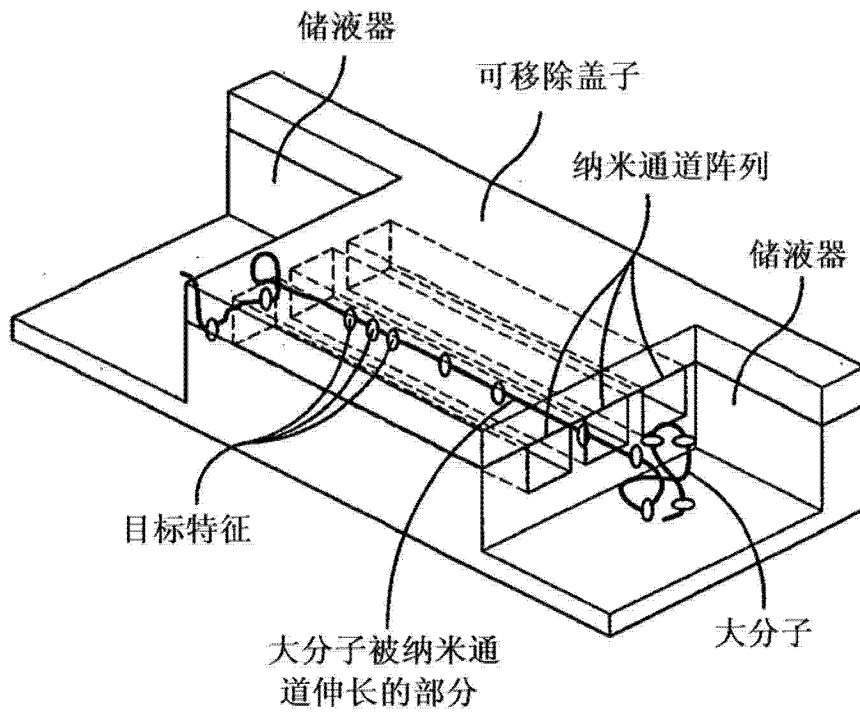


图 6A

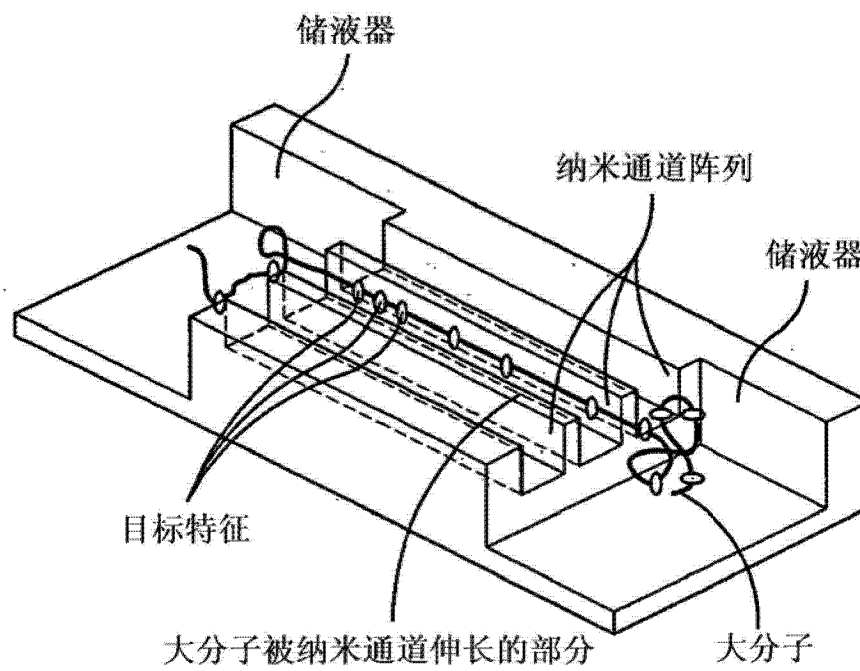


图 6B

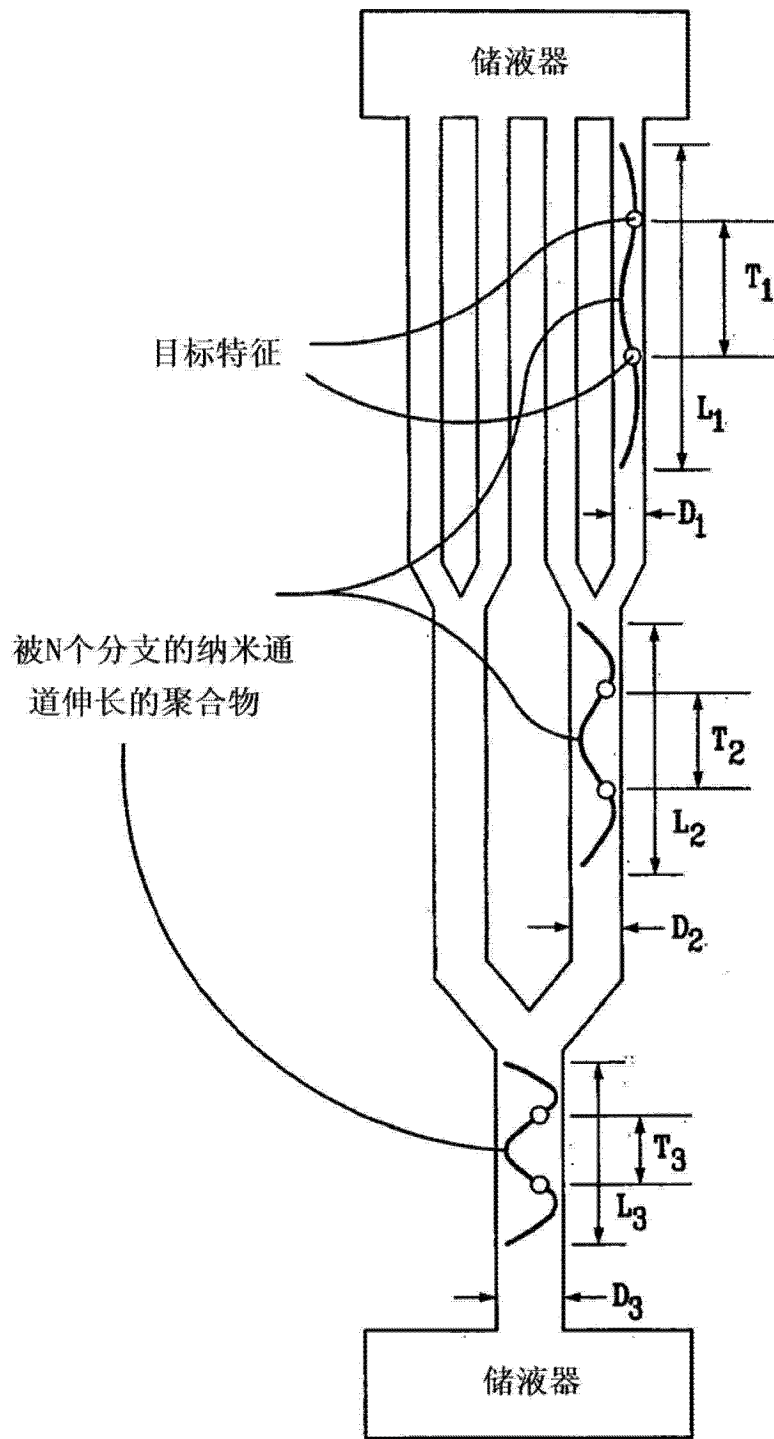


图 7

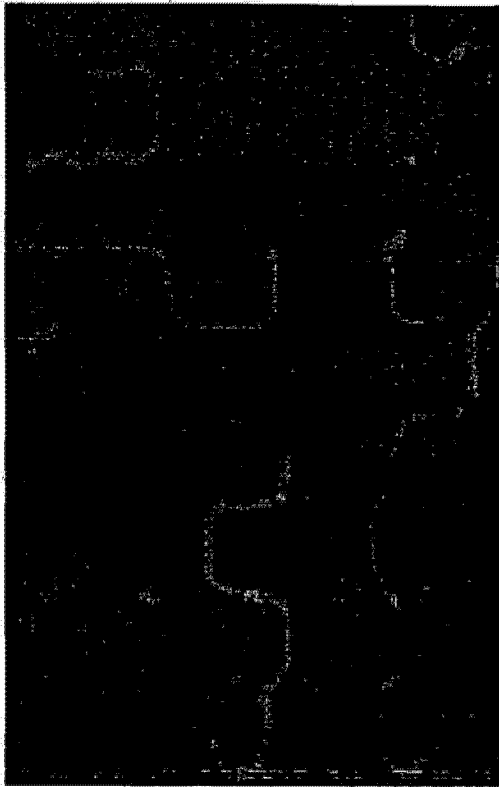


图 8A

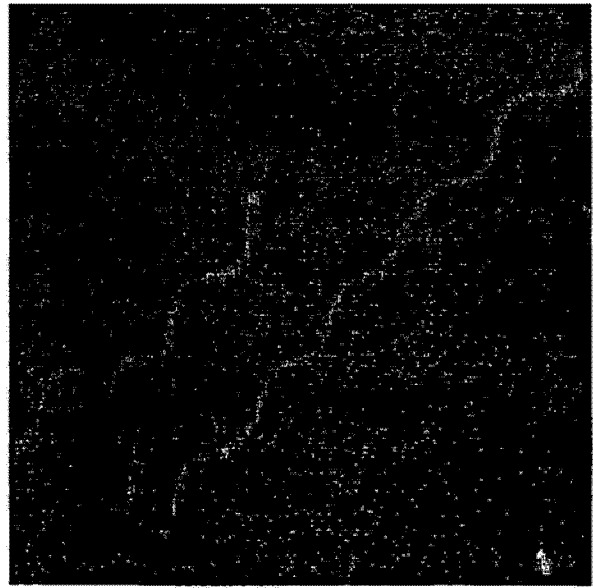


图 8B

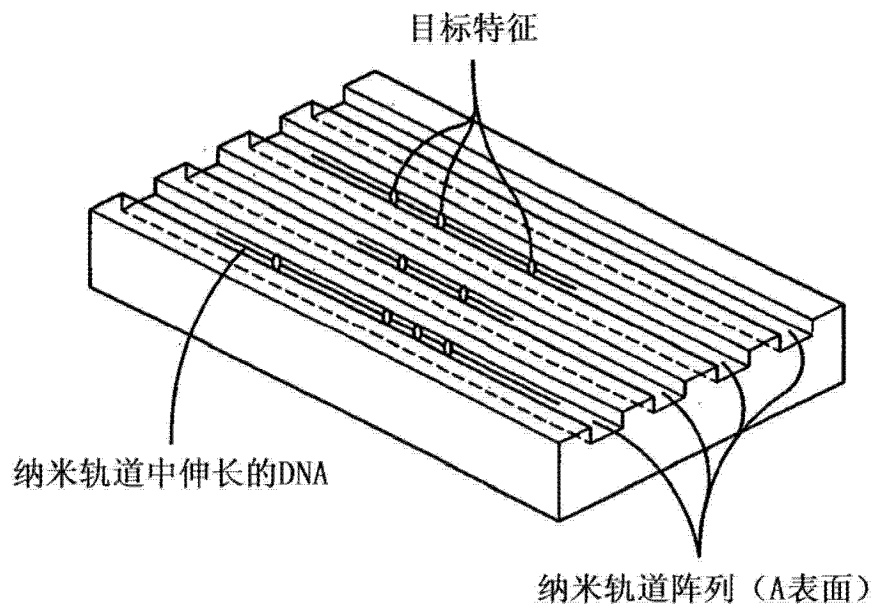


图 9A

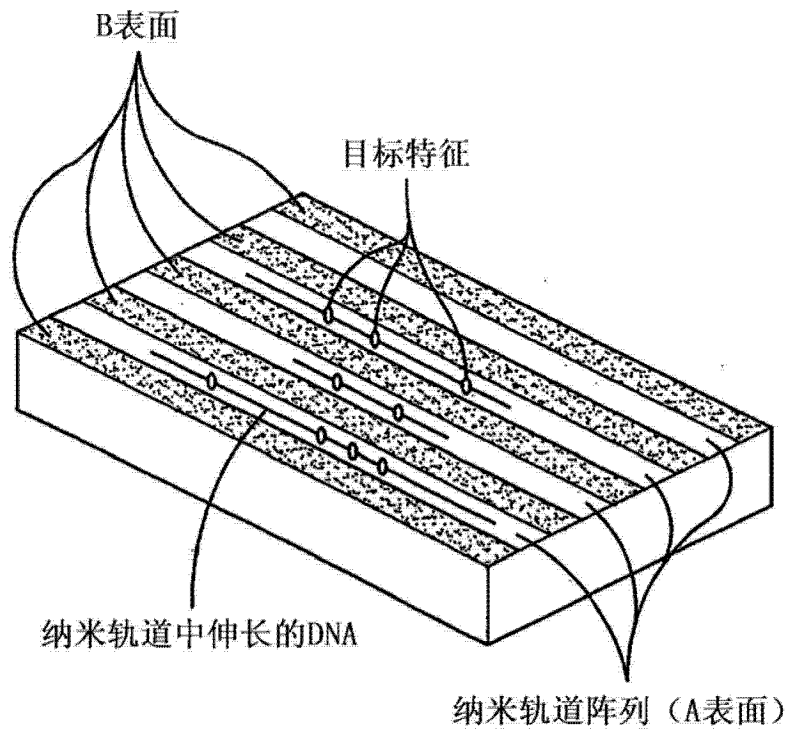


图 9B

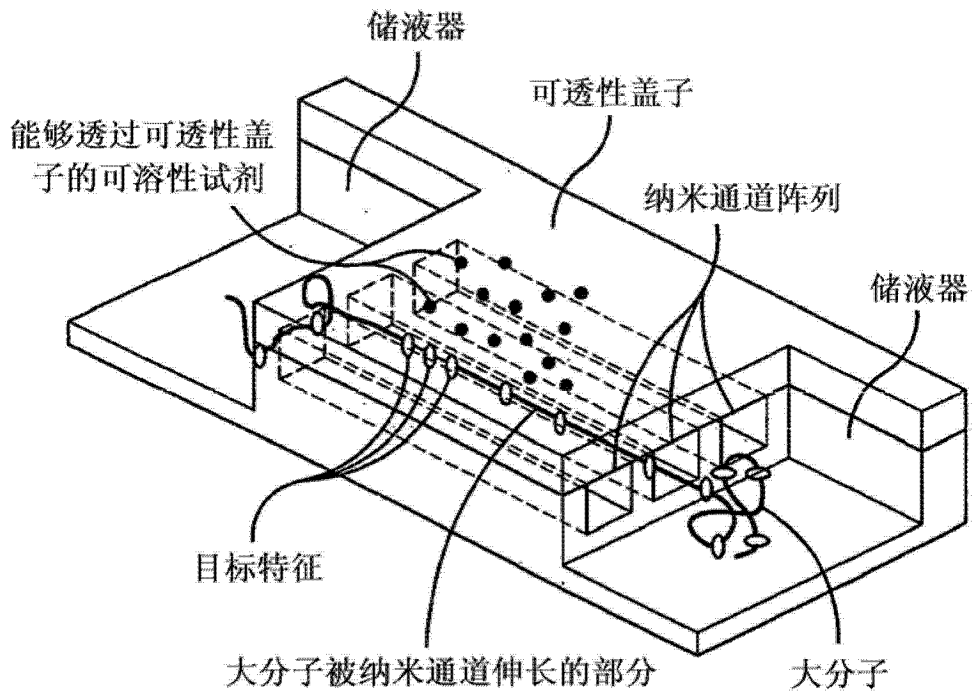


图 10

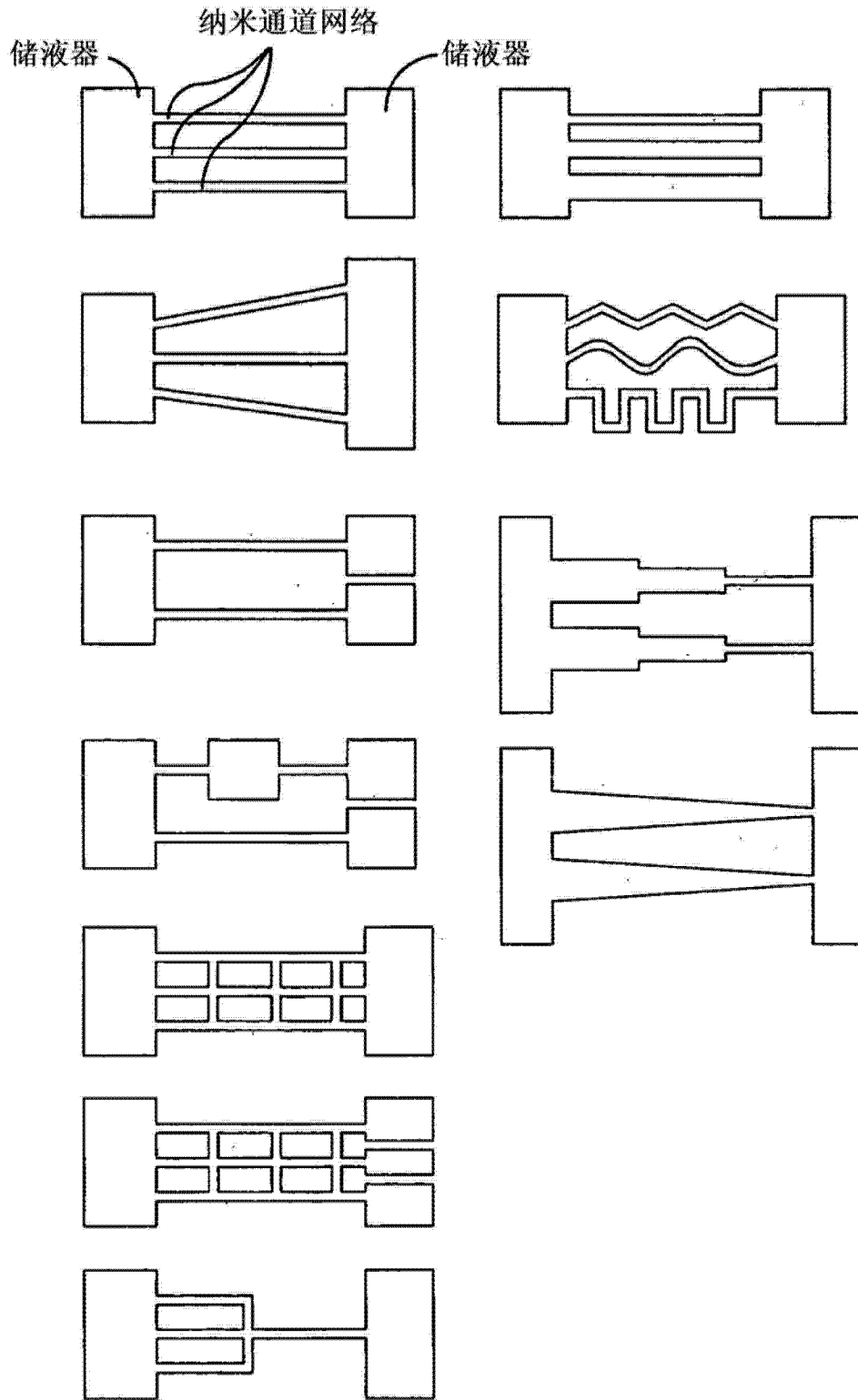


图 11

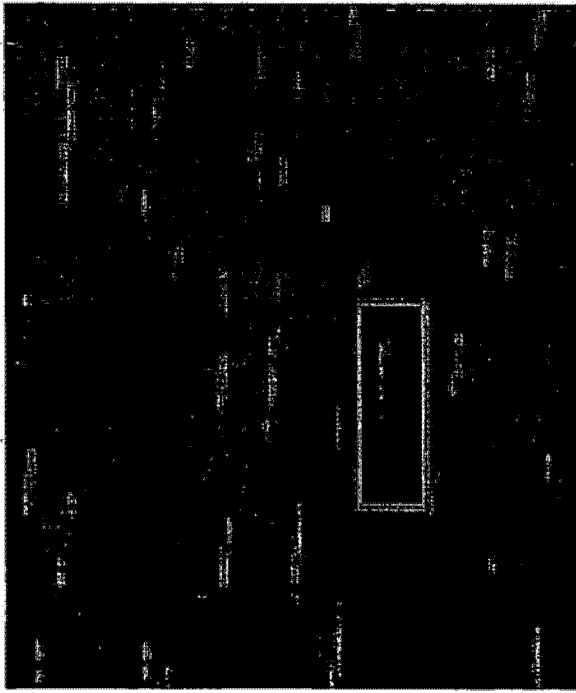


图 12A

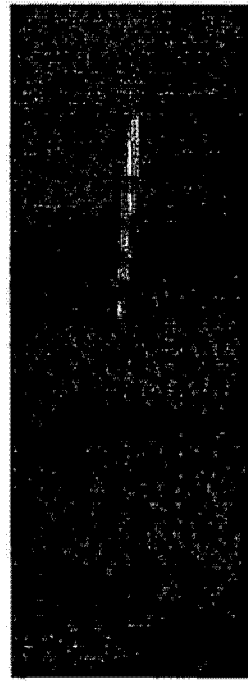


图 12B

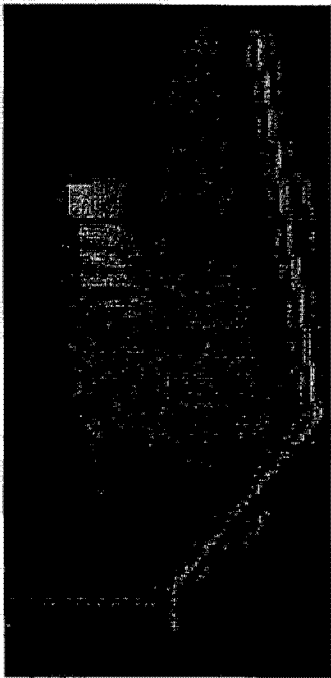


图 12C



图 13A

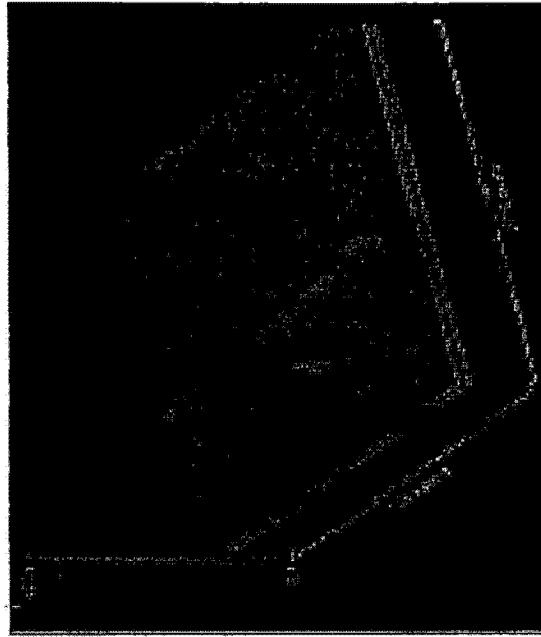
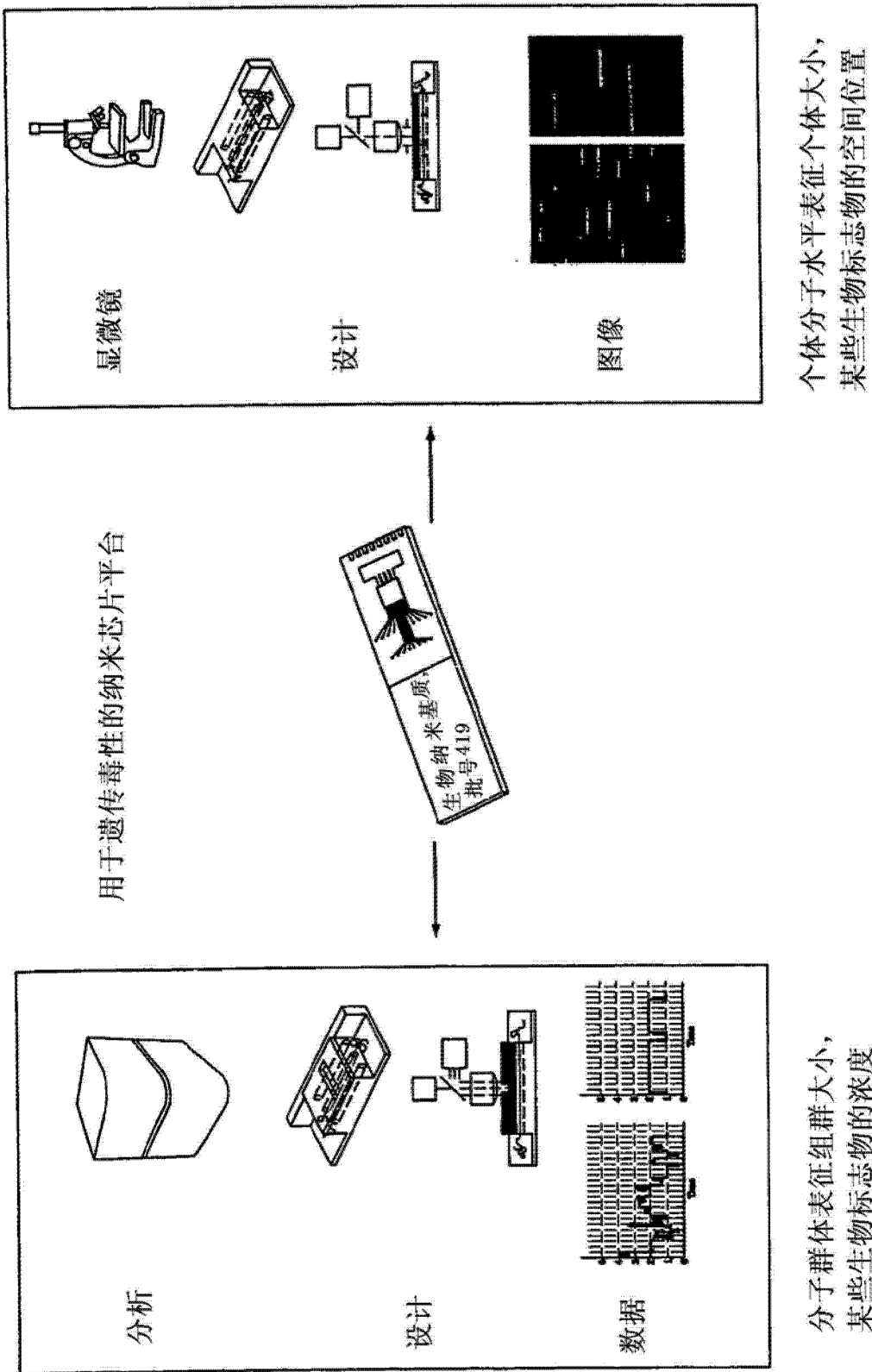


图 13B



个体分子水平表征个体大小，
某些生物标志物的空间位置

分子群体表征族群大小，
某些生物标志物的浓度

图 14

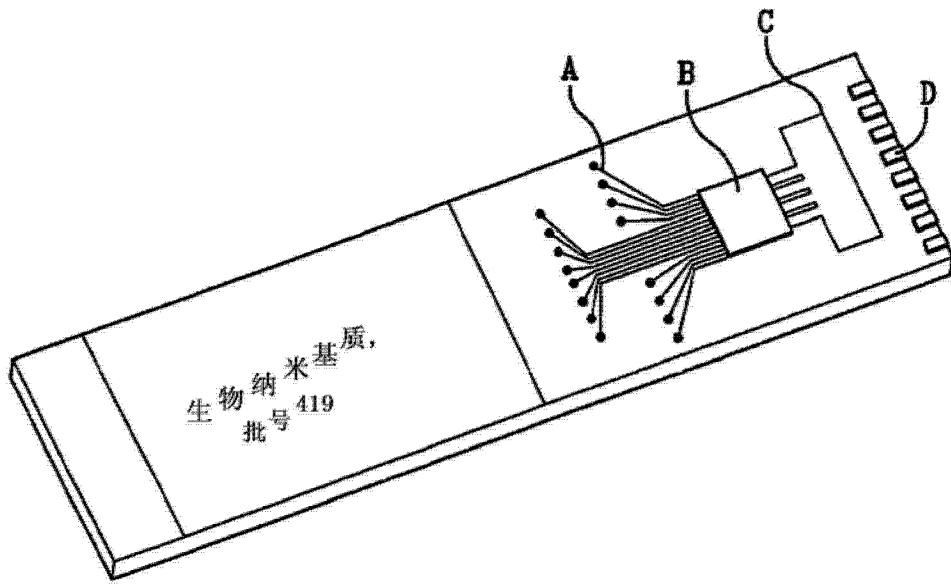


图 15

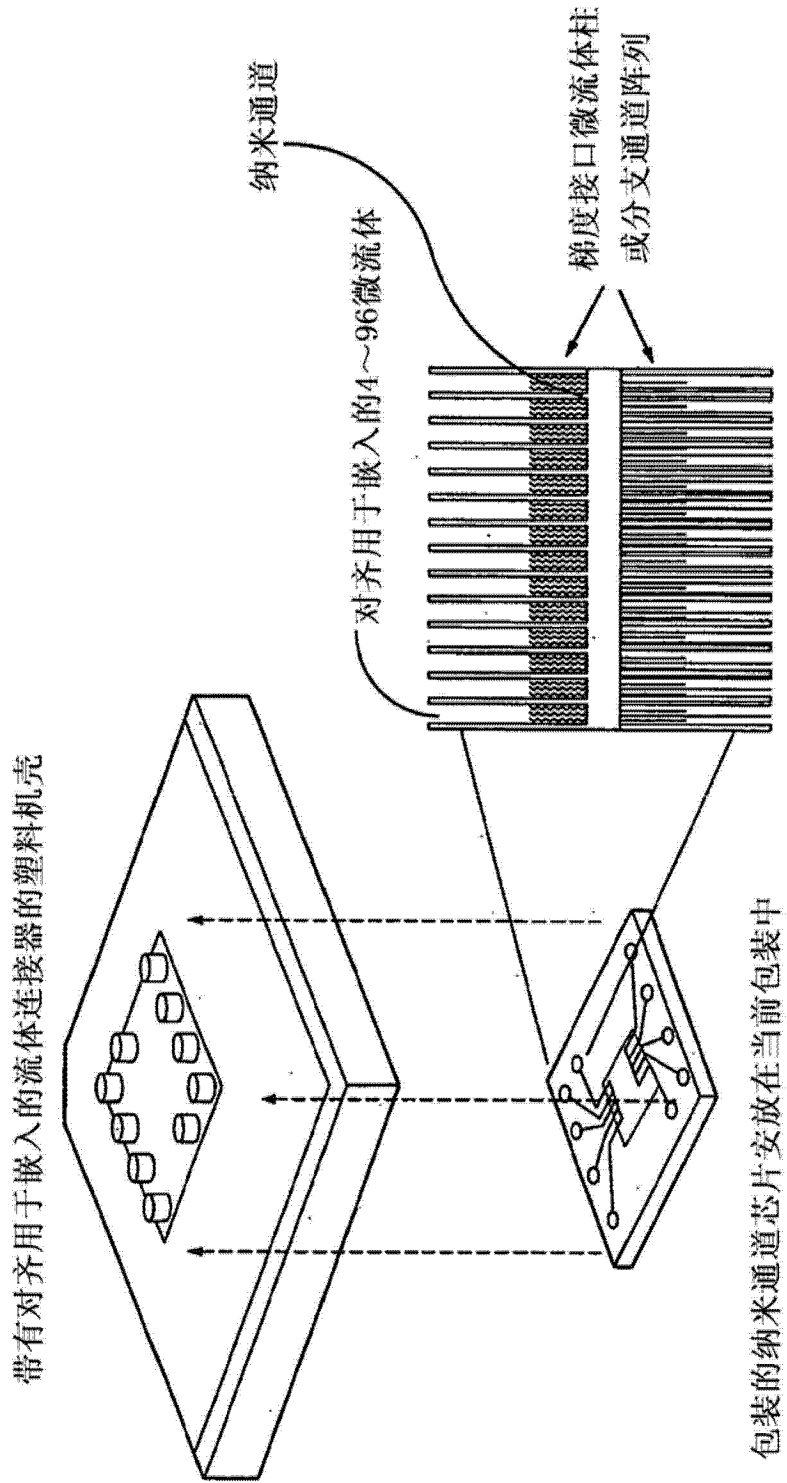


图 16

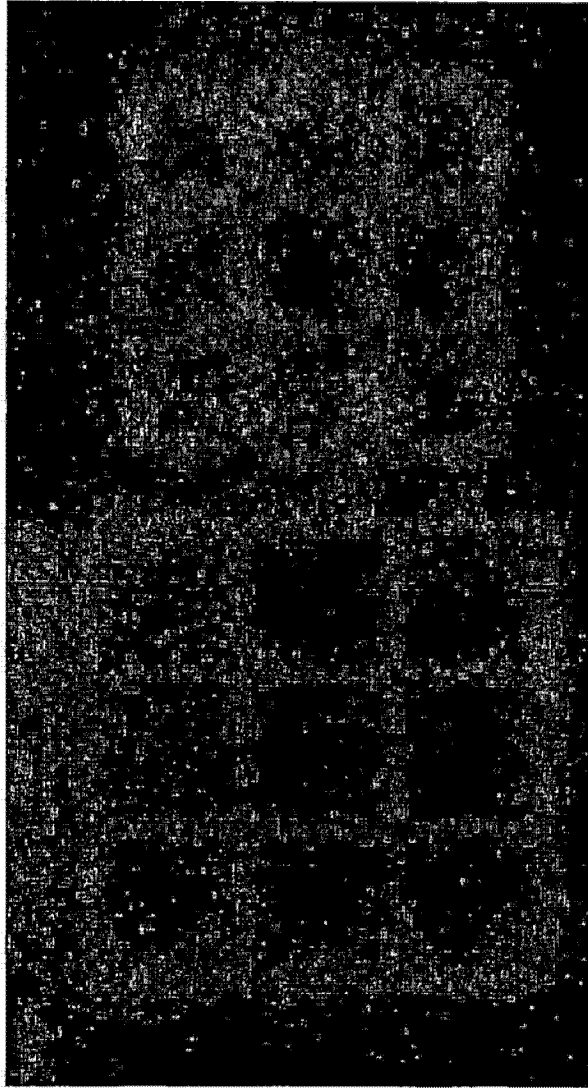


图 17

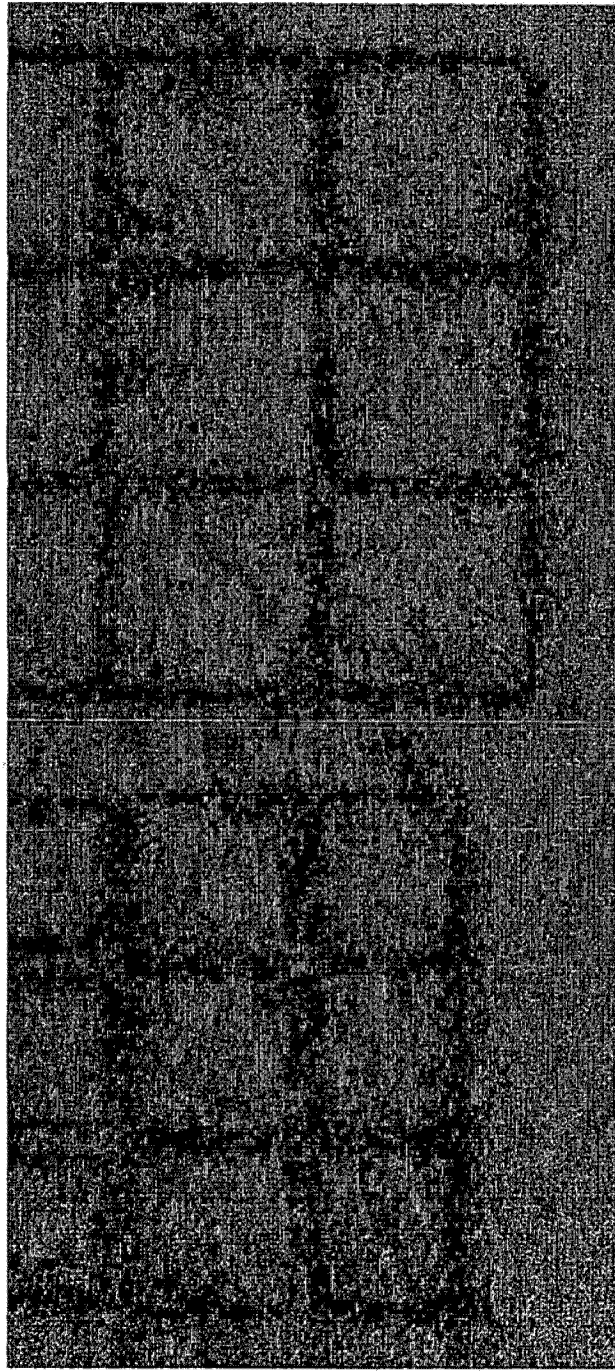


图 18

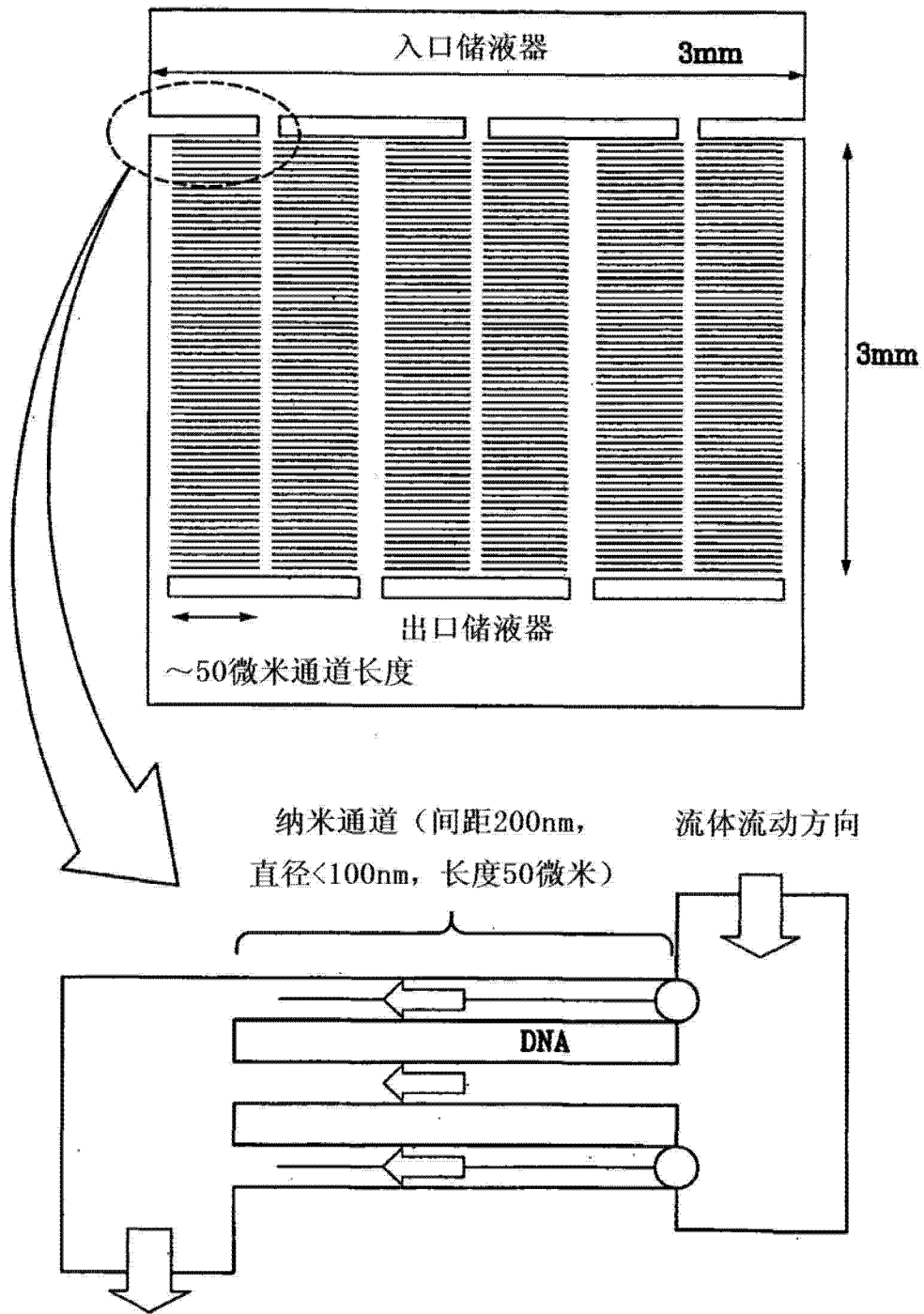


图 19