



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106442679 B

(45)授权公告日 2018.10.26

(21)申请号 201610833102.0

(22)申请日 2016.09.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106442679 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(73)专利权人 德州学院

地址 253023 山东省德州市德城区大学西路566号

(72)发明人 许士才 詹剑 王吉华 周耀旗

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 赵妍

(51)Int.Cl.

G01N 27/414(2006.01)

(56)对比文件

CN 103649739 A,2014.03.19,

CN 103649739 A,2014.03.19,

WO 2016010975 A2,2016.01.21,

CN 103323494 A,2013.09.25,

CN 105651845 A,2016.06.08,

CN 101789440 A,2010.07.28,

Yasuhide Ohno 等.《Direct Electrical Detection of DNA Hybridization Based on Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistor》.《Japanese Journal of Applied Physics》.2013,

Shicai Xu 等.《Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor》.《NATURE COMMUNICATIONS》.2017,

审查员 瓮龙明

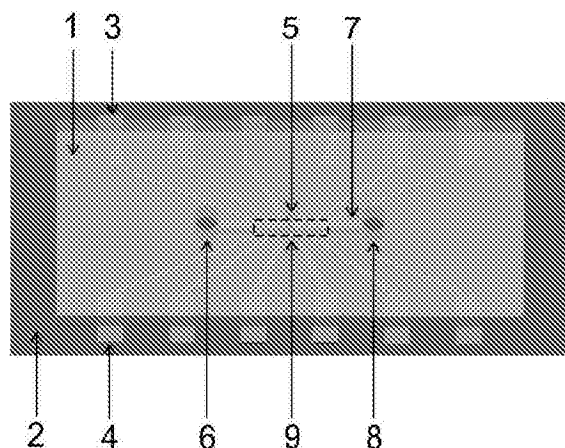
权利要求书1页 说明书9页 附图7页

(54)发明名称

一种检测分子之间结合能及结合动力学的传感装置及方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测分子之间结合能及结合动力学的传感装置及方法。传感装置由传感器、微流控芯片及测量电路组成。传感器由若干个场效应管组成,每个场效应管均采用单层石墨烯单晶作为导电沟道,具备极高的灵敏度和稳定性;场效应管呈阵列排布,并配有多通道测量电路,可以对不同分子或同一分子的不同副本的结合动力学过程进行并行探测,满足高通量检测要求。本发明采用与单层单晶石墨烯非共价结合的化合物为中介固定探针分子至导电沟道表面,从而保留石墨烯的本征结构,提高石墨烯场效应管检测信噪比和灵敏度。



1. 一种检测分子之间结合能及结合动力学的方法,其特征是,步骤为:

(1) 传感器的功能化:将化合物A的溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道表面,使化合物A与单晶石墨烯非共价结合,然后将探针分子通过微流控芯片注入传感器的导电沟道表面,使探针分子与化合物A共价结合,从而将探针分子通过化合物A固定在传感器的导电沟道上;或,将已与化合物A共价结合的探针分子的溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道表面,使探针分子通过化合物A固定在传感器的导电沟道上;

(2) 进样:将缓冲溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道中,直至检测的基线稳定为止;再将待测溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道中,使待测溶液中的待测分子与探针分子结合,并检测出结合反应的参数;在结合反应达到平衡状态后,将缓冲溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道中,使结合的待测分子与探针分子解离,并检测出解离过程的参数;

(3) 数据分析:通过方程1a-1b及步骤(2)检测得到的参数计算获得结合速率常数 k_a 和解离速率常数 k_d ,并通过关系式 $K_A = k_a/k_d$ 得出平衡常数 K_A ;

或,通过方程2及步骤(2)检测得到的参数直接计算得出平衡常数 K_A ;

方程为,

$$\Delta V_{cnp} = Q \frac{k_a [B]_{\max} [A]}{k_a [A] + k_d} (1 - e^{-(k_a [A] + k_d)t}) \quad (1a),$$

$$\Delta V_{cnp} = Q \frac{k_a [B]_{\max} [A]}{k_a [A] + k_d} e^{-k_d t} \quad (1b),$$

$$\Delta V_{cnp} = Q [B]_{\max} \frac{K_A [A]}{K_A [A] + 1} \quad (2),$$

其中, ΔV_{cnp} 为石墨烯电中性点的相对偏移量, Q 为与待测分子电荷、待测分子电荷分布和溶液介电常数相关的一个常数, k_a 为结合速率常数, k_d 为解离速率常数, K_A 为平衡常数, $[A]$ 为待测分子的浓度, $[B]_{\max}$ 为探针分子的最大密度;

所述传感器为以单层单晶石墨烯为导电沟道的场效应管传感器。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征是,所述传感器上设有若干个场效应管,且若干个场效应管排布成场效应管阵列,每个场效应管均以单层单晶石墨烯为导电沟道,所述场效应管阵列可进行并行检测。

一种检测分子之间结合能及结合动力学的传感装置及方法

技术领域

[0001] 本发明属于传感设备及检测方法技术领域,涉及一种检测分子之间结合能及结合动力学的传感装置及方法。

背景技术

[0002] 对分子之间的结合能及结合动力学的检测,在基础科学研究、新药的筛选和开发、疾病诊断、食品和药品工业的过程控制等方面具有重要应用价值。依据是否要求待测分子具备特定的标记,可以将检测方法分为依赖标记和不依赖标记两类。后者不要求待测分子具备特定的标记,而只依赖其物理特性如分子量和电荷量进行检测,具备操作方便,适应性广等优点。目前不依赖标记的分子之间结合能及结合动力学的检测主要是一种基于表面等离子体共振 (SPR) 原理的一类基于光学信号变化的传感器。这类传感器检测待测分子结合前后传感器表面的质量变化,其灵敏度和准确度依赖于待测分子的分子量,对于大分子量的待测分子该类传感器具有较高的探测精度,然而对于分子量 $<1000\text{Da}$ 的待测物,灵敏度和准确度较低;此外,该类传感器的搭建需要光源、棱镜等光学组件,难以实现低成本、小型化及高通量检测。医疗的个性化及精准化的要求对该类传感器提出了挑战,研发一种适合高、低分子量都能准确检测、低成本、小型便于携带、并能实现多路并行高通量检测的新型传感器是当前的迫切需求。

[0003] 石墨烯,是一种由碳原子构成的二维晶体,当用于场效应管的导电沟道时,可通过探测其电阻或电导的改变实现对某些分子的检测 (Schedin, F. et al. Nat. mater. 2007, 6, 652-655)。相比于SPR等检测方法,石墨烯传感器可以充分利用现代电子工业成熟的集成制造技术来实现低成本和小型化。该类传感器物理化学性能稳定、检测极限低、检测范围广、检测精确度高、能够实现高度集成,满足高通量的检测要求,方便与平板电脑、智能手机集成,不仅在常规的科学研究、工程检测、疾病诊断等领域具有广泛的应用价值,而且能够用于对检测时间、成本及设备尺寸有特殊限定的场景,如流动护理点、病床边诊断、救护车等。Zuccaro, Laura, et al. ACS nano, 2015, 9 (11), 11166-11176报道一种利用石墨烯场效应管制作酶亲和能传感器的方法,该方法通过电化学的方法对石墨烯进行了羧基化,并通过固定DNA探针,对拓扑异构酶进行了检测,通过拓扑异构酶引起的电场变化,估算出DNA与拓扑异构酶之间二者相互作用的平衡常数为 $3.62 \pm 0.27\text{nM}$ 。但该方法存在较多局限性:其一,石墨烯功能化过程引入较多缺陷,破坏了石墨烯的本征结构,传感器的灵敏度和信噪比较差;其二,石墨烯场效应管采用多晶石墨烯,晶畴和缺陷的杂乱分布使石墨烯性能均一性较差,不同器件测量的数据差异较大,结果准确性较差;其三,探针分子与石墨烯共价结合,再生困难,传感芯片不能重复使用。由于灵敏度、信噪比、准确性及非再生性等因素的制约,现有的该类传感器只能用于有限的分析体系,难以成为一种广谱、标准化的分析方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供了一种检测分子之间结合能及结合

动力学的传感装置及方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0006] 一种检测分子之间结合能及结合动力学的传感器,所述传感器中的场效应管以单层单晶石墨烯为导电沟道。

[0007] 优选的,所述传感器上设有若干个场效应管,且若干个场效应管排布成场效应管阵列,每个场效应管均以单层单晶石墨烯为导电沟道,所述场效应管阵列可进行并行检测。

[0008] 所述场效应管阵列为若干场效应管排列成的直线形阵列、矩形阵列、环形阵列、蛇形等。

[0009] 进一步优选的,每个场效应管中的单晶石墨烯均取自同一大片的单晶石墨烯。以提高传感器不同石墨烯场效应管阵列点性能的一致性。

[0010] 优选的,包括化合物A,所述化合物A与单晶石墨烯非共价结合。

[0011] 优选的,所述化合物A为既能与单晶石墨烯非共价结合,同时又能与探针分子共价结合的化合物。

[0012] 进一步优选的,进一步包括探针分子,所述探针分子与化合物A共价结合。

[0013] 优选的,所述场效应管在绝缘基底的上表面中部铺设单层单晶石墨烯,形成导电沟道;在单层单晶石墨烯的两侧的上方设置金属层、绝缘层及微流体通道侧壁,使单晶石墨烯单层、绝缘层、及微流通道侧壁形成通道,其中,一侧金属层为场效应管的源极,另一侧金属层为场效应管的漏极;所述场效应管的栅极设置在单晶石墨烯单层的上方。

[0014] 优选的,所述传感器上设有若干引出电极,所述引出电极为能够将场效应管的源极或漏极引出至微流控芯片外的导电体。

[0015] 优选的,所述场效应管为液栅型场效应管。

[0016] 进一步优选的,所述绝缘基底为石英、蓝宝石、碳化硅或带有热氧化层的硅。

[0017] 进一步优选的,所述金属层为Cr/Au复合金属层。

[0018] 更进一步优选的,所述Cr/Au复合金属层中Cr层的厚度为15-30nm,Au层厚度为50-150nm。

[0019] 进一步优选的,所述绝缘层通过原子层沉积或化学气相沉积所制备。

[0020] 进一步优选的,所述绝缘层的材质为 Al_2O_3 或 Si_3N_4 。

[0021] 进一步优选的,所述绝缘层的厚度为60-100nm。

[0022] 一种检测分子之间结合能及结合动力学的传感装置,包括上述传感器、微流控芯片及测量电路。

[0023] 所述微流控芯片上设有凹槽、进样口、出样口、栅极入口,所述进样口、出样口分别与凹槽两端连通,所述微流控芯片凹槽与所述传感器的上表面组成流体通道,且使所述传感器内的场效应管阵列处于流体通道内,从而使流体样品从进样口进入流体通道流经场效应管的导电沟道并从出样口流出;场效应管的栅极通过栅极入口对准导电沟道。

[0024] 优选的,所述微流控芯片上设有若干凹槽、若干进样口、若干出样口,一个进样口、一个出样口分别与一个凹槽两端连通,所述微流控芯片的若干凹槽与所述传感器的上表面组成若干流体通道,且使所述传感器内的场效应管或场效应管阵列分布在若干流体通道内。

[0025] 所述测量电路包含一个或多个电流源、微控制器和A/D转换器,可选地包含一个或

多个参比电阻；所述电流源输出激励电流通过漏极接口和源极接口经过石墨烯场效应管的漏极与源极，再经过一个可选的参比电阻，A/D转换器测量石墨烯场效应管和可选的参比电阻之上的电压，并通过计算出石墨烯场效应管漏极与源极之间的电导；在计算机控制下，通过监测石墨烯场效应管漏极与源极之间的电导随栅极电压及流经石墨烯沟道的液体的组分的变化，测量电路可以测量石墨烯沟道的电中性点 V_{cnp} 以及电中性点的相对偏移量 ΔV_{cnp} 并输出至计算机。

[0026] 优选的，所述栅极为铂丝、镍铬丝或Ag/AgCl电极。

[0027] 优选的，所述微流控芯片通过焊接、粘合、紧固或钳夹与所述传感器连接。

[0028] 优选的，所述微流控芯片的材质为玻璃、石英、PMMA、PDMS、PEEK、PAEK、PC、PET、PS、PPS、PI、PSF、PVA或PVMK。

[0029] 优选的，所述微流控芯片的进样口、出样口及栅极入口的内径均小于1mm。

[0030] 优选的，所述传感装置通过测量电路与计算机相连。在计算机控制之下输出指定的电压至石墨烯场效应管的栅极。同时测量石墨烯场效应管漏极与源极之间的电导。

[0031] 进一步优选的，所述测量电路通过串口、并口、USB接口或以太网同计算机相连。

[0032] 进一步优选的，所述测量电路包含一个或多个连接至栅极接口的D/A转换器，计算机可以控制D/A转换器输出指定的电压至石墨烯场效应管的栅极。

[0033] 进一步优选的，所述测量电路其栅极电压的输出范围为-10V~+10V，输出的相对精度优于1%。

[0034] 进一步优选的，所述测量电路能够同时连接所述传感装置的多组源极、漏极和栅极。可实现多路并行测量，高通量检测的目的。

[0035] 进一步优选的，所述测量电路对漏极与源极间电导测量的相对精度优于1%，采样速度大于1sps。

[0036] 一种检测系统，包括上述传感器及化合物A。

[0037] 一种上述传感器、上述传感装置或上述检测系统在检测分子结合能及结合动力学中的应用。

[0038] 一种利用上述传感装置检测分子之间结合能及结合动力学的方法，首先将探针分子通过化合物A固定在上述传感器的单层单晶石墨烯导电沟道表面，再将待测溶液通过微流控芯片注入传感装置中进行检测，传感装置通过测量电路将检测数据传输至计算机，根据计算机得到的检测数据进行分析计算。

[0039] 优选的，将化合物A以非共价形式结合在单层单晶石墨烯表面，将探针分子以共价形式与化合物A结合，从而将探针分子固定在传感器的导电沟道上。

[0040] 优选的，步骤为：

[0041] (1) 传感器的功能化：将化合物A的溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道表面，使化合物A与单晶石墨烯非共价结合，然后将探针分子通过微流控芯片注入传感器的导电沟道表面，使探针分子与化合物A共价结合，从而将探针分子通过化合物A固定在传感器的导电沟道上；或，将已与化合物A共价结合的探针分子的溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道表面，使探针分子通过化合物A固定在传感器的导电沟道上；

[0042] (2) 进样：将缓冲溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道中，直至检测的基线稳定为止；再将待测溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道中，使待测溶液中的待测

分子与探针分子结合,并检测出结合反应的参数;在结合反应达到平衡状态后,将缓冲溶液通过微流控芯片注入传感器的导电沟道中,使待测分子与探针分子解离,并检测出解离过程的参数;

[0043] (3) 数据分析:通过方程1a-1b及步骤(2)检测得到的参数计算获得结合速率常数 k_a 和解离速率常数 k_d ,并通过关系式 $K_A = k_a/k_d$ 得出平衡常数 K_A ;

[0044] 或,通过方程2及步骤(2)检测得到的参数直接计算得出平衡常数 K_A ;

[0045] 方程为,

$$[0046] \quad \Delta V_{cnp} = Q \frac{k_a [B]_{\max} [A]}{k_a [A] + k_d} (1 - e^{-(k_a [A] + k_d)t}) \quad (1a),$$

$$[0047] \quad \Delta V_{cnp} = Q \frac{k_a [B]_{\max} [A]}{k_a [A] + k_d} e^{-k_d t} \quad (1b),$$

$$[0048] \quad \Delta V_{cnp} = Q [B]_{\max} \frac{K_A [A]}{K_A [A] + 1} \quad (2),$$

[0049] 其中, ΔV_{cnp} 为石墨烯电中性点的相对偏移量, Q 为与待测分子电荷、待测分子电荷分布和溶液介电常数相关的一个常数, k_a 为结合速率常数, k_d 为解离速率常数, K_A 为平衡常数, $[A]$ 为待测分子的浓度, $[B]_{\max}$ 为探针分子的最大密度。

[0050] 优选的,所述缓冲溶液为具有缓冲作用的溶液。

[0051] 进一步优选的,所述缓冲溶液为磷酸盐(PBS)缓冲液、柠檬酸盐(SSC)或三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-HCl)。

[0052] 进一步优选的,所述化合物A为1-芘丁酸琥珀酰胺酯(PBASE)、1-芘丁酸(1-pyrenebutyric acid)、4-(1-芘基)-1-丁醇(1-pyrenebutanol)、1-芘乙酸(1-pyreneacetic acid)、1-芘甲酸(1-pyrenecarboxylic acid)或1-芘硼酸(pyrene-1-boronic acid)。

[0053] 优选的,所述探针分子为蛋白质、DNA、RNA、小分子或大分子。

[0054] 优选的,所述待测分子为蛋白质、DNA、RNA、小分子或大分子。

[0055] 当根据本发明测量蛋白质与配体结合过程的结合能和结合动力学参数时,可以将蛋白质作为探针分子,将配体作为待测分子;也可以将配体作为探针分子,将蛋白质作为待测分子。当配体所带电荷较小时,推荐将配体作为探针分子,将蛋白质作为待测分子;每个石墨烯场效应管阵列点修饰的探针分子可以相同也可以不同;优选的,蛋白质的分子量为5kDa~300kDa,配体的分子量为0.1kDa~300kDa。

[0056] 当根据本发明测量蛋白质之间的结合能和结合动力学参数时,探针分子为一种蛋白质,待测分子为另一种蛋白质。每个石墨烯场效应管阵列点修饰的探针蛋白质可以相同也可以不同;优选的,探针蛋白质的大小为5kDa~300kDa,待测蛋白质的大小为5kDa~300kDa;探针蛋白质或待测蛋白质可以为抗体或抗原。

[0057] 当根据本发明测量DNA杂交过程的结合能和结合动力学参数时,探针分子为DNA,待测分子为DNA或RNA。每个石墨烯场效应管阵列点修饰的DNA探针可以相同也可以不同;优选的,探针DNA的长度为10~50个碱基,待测DNA或RNA的长度为10~70个碱基,探针DNA与待测DNA或RNA可以完全互补配对也可以部分互补。

[0058] 探针分子与化合物A的共价连接方法应该根据探针分子的性质和反应基团来制

定。当探针分子具备伯氨基时,可以选择末端带NHS酯基的化合物A,在pH 7.2-8.5的水溶液中在探针分子和化合物A间形成共价的酰胺键连接;当探针分子具备叠氮基时,可以使用Huisgen叠氮化物-炔烃环加成反应与末端有炔键的化合物A共价连接。

[0059] 当根据本发明测量DNA杂交过程的结合能和结合动力学参数时,优选的,使用末端带NHS酯基的PBASE分子作为与石墨烯非共价结合的化合物A;步骤(1)中化合物A溶液溶剂为二甲基甲酰胺(DMF),浓度为1~10mM,孵育温度为室温,孵育时间为1~3h;使用5'端氨基化的单链DNA作为探针分子;探针分子溶液浓度为50~100 μ M,溶剂为磷酸盐(PBS)缓冲液,孵育温度为室温,孵育时间为1~3h;步骤(2)所述缓冲液为0.005 \times ~1 \times 磷酸盐(PBS),或0.005 \times ~1 \times 柠檬酸盐(SSC);待测DNA的注入速度为2~60 μ l/min,保持恒定;解离过程中纯缓冲液注入的速度也为2~60 μ l/min,保持恒定。

[0060] 一种恢复上述传感器检测能力的方法,使用强度较弱的再生溶液,洗去待测分子,从而恢复传感器重新检测待测分子的能力;或,使用强度较强的再生溶液,洗去化合物A、探针分子及待测分子,从而恢复传感器重新检测待测分子的能力。

[0061] 优选的,所述强度较弱的再生溶液为5~15mM NaOH或1~5mM HCl,作用时间为10~90s,用于洗去待测分子。

[0062] 优选的,所述强度较强的再生溶液为50~100mM NaOH或5~10mM HCl,作用时间为120~300s,同时洗去化合物A、探针分子及待测分子。

[0063] 本发明中,石墨烯场效应管传感器采用单层单晶石墨烯作为场效应管导电沟道,具备极高的灵敏度和稳定性。传感器中场效应管呈阵列排布,并配有多通道测量电路,可以对不同生物分子或同一生物分子的不同副本的结合动力学过程进行并行探测,满足高通量检测要求。本发明采用与石墨烯非共价结合的化合物A为中介固定探针分子,保留了单层单晶石墨烯的本征结构,提高了石墨烯场效应管检测信噪比和灵敏度。通过对DNA杂交亲和能和动力学过程的检测,本装置对纳摩尔级DNA亲和能及结合、解离速率的测量误差低于10%,且能够准确识别DNA序列的单位点及多位点突变的存在、位置及突变的核苷酸碱基。本发明的有益效果

[0064] 1、本发明的装置采用单层单晶石墨烯作为场效应管导电沟道,提升了装置的灵敏度和稳定性,保证了测量结果的可靠性。当应用于DNA杂交亲和能的检测时,对纳摩尔级浓度的DNA亲和能的测量误差低于10%。

[0065] 2、本发明的装置所使用的传感器采用石墨烯场效应管阵列设计,并配有多通道测量电路可以对不同分子或同一分子的不同副本的结合能及动力学过程进行并行探测,满足高通量检测要求。

[0066] 3、本发明的装置采用与石墨烯非共价结合的化合物A为中介固定探针分子,保留了单层单晶石墨烯的本征结构,提高了石墨烯的检测灵敏度和信噪比。当应用于DNA杂交亲和能和动力学过程的检测时,能准确区分DNA序列的单个位点突变以及不同位点突变及突变的核苷酸碱基。

[0067] 4、本发明的装置所使用的传感器在合理的再生后可以反复使用,从而降低单次检测的成本。

[0068] 5、本发明提供了利用上述装置检测分子结合能及结合动力学的方法,具有分析精度高、准确性高、性能可靠及可重复使用等特点,可广泛用于多类分子结合平衡常数及动力

学参数测量,有望成为一种标准化的分析方法,在生命科学基础研究、新药的筛选和开发、疾病诊断、食品和药品工业的过程控制等方面具有重要应用价值。

附图说明

- [0069] 图1是本发明传感装置的结构示意图。
- [0070] 图2是本发明传感器(石墨烯场效应管阵列)光学显微图。
- [0071] 图3是本发明单个石墨烯场效应管剖面示意图。
- [0072] 图4是本发明测量电路示意图。
- [0073] 图5是实施例1传感器与微流控芯片装配实物图。
- [0074] 图6是实施例1所使用的单层单晶石墨烯的扫描电子显微镜(SEM)照片。
- [0075] 图7是实施例2探针分子固定到石墨烯表面以及待测分子与探针分子结合的示意图。
- [0076] 图8是实施例2所测量的DNA杂交过程的动力学传感图。
- [0077] 图9是实施例2所测量的DNA杂交响应平衡数值与DNA浓度的关系图。
- [0078] 图10是实施例3所测量的完全匹配DNA杂交与单个位点失配杂交动力学传感对比图。
- [0079] 图11是实施例3所测量的完全匹配DNA杂交与单个位点失配杂交对应响应平衡数值与DNA浓度的关系图。
- [0080] 图12是实施例4所测量的DNA不同位点失配DNA杂交过程的动力学传感图。
- [0081] 图13是实施例5所测量的不同类型突变的动力学传感图。
- [0082] 图14是实施例6传感装置的5次检测能力恢复(重生)结果及再生后对不同浓度DNA T20的探测结果;
- [0083] 其中,1、微流控芯片,2、传感器,3、源极引出电极,4、漏极引出电极,5、栅极入口,6、进样口,7、凹槽,8、出样口,9、石墨烯场效应管阵列,10、源极,11、漏极,12、单层单晶石墨烯,13、绝缘层,14、微流通道侧壁,15、栅极,16、待测溶液,17、绝缘基底。

具体实施方式

- [0084] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步说明。
- [0085] 实施例1:一种检测分子之间结合能及结合动力学的传感装置,如图1、5所示,包括传感器2和微流控芯片1;
- [0086] 如图2所示,传感器2上设有若干个场效应管,且若干个场效应管排布成场效应管阵列9,每个场效应管均设有单层单晶石墨烯12构成的导电沟道,所有场效应管阵列形成多个并行检测通道。采用的单层单晶石墨烯如图6所示;
- [0087] 微流控芯片1上设有凹槽7、进样口6、出样口8、栅极入口5,进样口6、出样口8、栅极入口5设置在微流控芯片1的上侧,进样口6、出样口8分别与凹槽7两端连通;
- [0088] 传感器2安装于微流控芯片1带有凹槽7的一侧,使凹槽7与传感器2组成流体通道,石墨烯场效应管阵列9位于流体通道内,从而使待测溶液16通过进样口6经流体通道从出样口8流出,待测溶液16流经流体通道时与作为场效应管的导电沟道的单层单晶石墨烯12接触;场效应管的栅极通过栅极入口5对准作为场效应管的导电沟道的单层单晶石墨烯12。

[0089] 传感器2上设有若干引出电极,包括源极引出电极3和漏极引出电极4;引出电极为能够将场效应管的源极或漏极引出至微流控芯片外的导电体,使测量电路能够连接源极和漏极。

[0090] 如图2-3所示,传感器2中的场效应管在绝缘基底17的上表面中部铺设单层单晶石墨烯12作为导电沟道,在单层单晶石墨烯12的两侧分别从下向上设置金属层、绝缘层13及微流通道侧壁14,场效应管的栅极15设置在单层单晶石墨烯12的上方,其中,一侧金属层为场效应管的源极10,另一侧金属层为场效应管的漏极11。

[0091] 传感器2中,单层单晶石墨烯12的两侧的金属层在远离单晶石墨烯单层的一侧均露出。

[0092] 传感器2以带有300nm热氧化层的Si为绝缘基底17;源极10和漏极11是由20nm Cr和100nm Au复金属材料通过磁控溅射的方法沉积而成,并分别通过源极引出电极3和漏极引出电极4引出与测量电路相连接;该场效应管采取液体顶栅结构,以铂丝为栅极15,栅极由栅极入口5进入凹槽7,为场效应管提供栅极电压;80nm Si_3N_4 层绝缘作为顶绝缘层13镀在场效应管上表面(除了单晶石墨烯单层12及电极引出端所在区域),以消除栅极与源极、漏极之间的寄生电流。PMMA材质的微流控芯片1通过粘合固定于传感器2的顶部,单层单晶石墨烯12位于流体通道内,进样口6和出样口8位于凹槽7的两端,样品溶液16从进样口6流入从出样口8流出。石墨烯场效应管阵列9的栅极15与测量电路的栅极电压输出端连接,测量电路如图4所示,其漏极11通过漏极引出电极4与测量电路的漏极端连接,源极10通过与源极引出电极3与测量电路的源极端连接。测量电路与计算机相连,可以通过软件获得测量数据并进行数据分析。

[0093] 实施例2:利用实施例1的装置DNA杂交的亲合能。探针分子固定到石墨烯表面以及待测分子与探针分子结合的过程如图7所示。

[0094] (1)用注射泵将10mM 1-苄丁酸琥珀酰胺酯(PBASE)的二甲基甲酰胺(DMF)溶液通过微流控芯片注入到石墨烯单晶表面,室温下孵育1h后,注入纯DMF洗去过量的PBASE;注入100mM 5'端氨基化单链DNA(序列: $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-5'-\text{GAGTTGCTACAGACCTTCGT}-3'$,编号:P20)水溶液到石墨烯表面,室温下孵育6h,固定DNA探针P20至石墨烯单晶表面;

[0095] (2)将待测DNA(序列: $3'-\text{CTCAACGATGTCTGGAAGCA}-5'$,编号:T 20)加入到 $0.01 \times$ PBS缓冲液中,配成待测样品溶液组(浓度:0.25,0.5,1,2.5,5,10nM),并设置无关序列DNA为对照实验(序列: $3'-\text{ACATGTAGGTTTGATATGAT}-5'$,编号:U20);用注射泵将样品溶液通过微流控芯片注入到功能化的石墨烯表面,保持恒定的 $60\mu\text{l}/\text{min}$ 注入速度,并通过测量电路监测此杂交反应过程;杂交反应达到平衡状态后,将含有待测DNA的样品溶液切换为纯缓冲溶液,由注射泵以恒定的 $60\mu\text{l}/\text{min}$ 注入速度注入,监测双链DNA的解离过程;

[0096] (3)通过实时的动力学过程得出动力学常数和平衡常数:通过对方程(1)的拟合得出结合速率常数 k_a 和解离速率常数 k_d ,并通过关系式 $K_A = k_a/k_d$ 得出平衡常数 K_A 。

[0097] 拟合结果如下表所示:

[0098] 表1.不同石墨烯场效应管拟合得到的P20-T20杂交代动力学参数及平衡常数

[0099]

	G-FET 1	G-FET 2	G-FET 3	G-FET 4	G-FET 5	G-FET 6
$k_a (\times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	2.61(0.11) ^c	2.68(0.12)	2.36(0.13)	2.73(0.09)	2.38(0.20)	2.70(0.18)
$k_d (\times 10^{-4} \text{s}^{-1})$	1.08(0.07)	1.13(0.04)	1.02(0.06)	1.23(0.10)	1.10(0.08)	1.15(0.07)
$K_A (\times 10^9 \text{M}^{-1})^a$	2.35	2.37	2.31	2.22	2.16	2.42
$K_A (\times 10^9 \text{M}^{-1})^b$	2.37	2.30	2.26	2.23	2.11	2.39

[0100] ^a通过关系式 $K_A = k_a/k_d$ 得出；^b通过拟合平衡响应值与待测DNA浓度的关系曲线得出；^c数值来自6个通道的独立测量的拟合结果的均值，括号中为传感装置再生后对不同浓度T20检测的标准差，其余类同。

[0101] 本实施例所测得的结果如图8-9所示。

[0102] 实施例3:利用实施例1的装置对比完全匹配DNA杂交与单个位点失配杂交差异。

[0103] 如实施例2所述,所不同的是:

[0104] 步骤(1)中,PBASE的浓度为5mM,5'端氨基化的探针DNA(序列:H2N-(CH₂)₆-5'-ACCAGGCGGCCGCACACGTCCTCCAT-3';编号:P26);

[0105] 步骤(2)中,待测DNA为完全匹配DNA(序列:3'-TGGTCCGCCGGCGTGTGCAGGAGGTA-5',编号:T26)和单个位点失配DNA(序列:3'-TGGTCCGCCGGCGTGTGCAGGAGGTA-5',编号:T26(TC13));两种待测DNA样品溶液的浓度皆为5nM;

[0106] 步骤(3)同实施例2,拟合结果如下表所示:

[0107] 表2.P26-T26、P26-T26(TC13)杂交作用的动力学参数及平衡常数

[0108]

	$k_a (\times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_d (\times 10^{-4} \text{s}^{-1})$	$K_A (\times 10^9 \text{M}^{-1})$
P26-T 26	2.87 (0.18)	9.26 (0.13)	3.10 (0.21)
P26-T26 (TC13)	2.10 (0.21)	1.17 (0.10)	1.80 (0.18)

[0109] 本实施例所测得的结果如图10-11所示。

[0110] 实施例4:利用实施例1的装置对比DNA不同位点失配DNA杂交差异。

[0111] 如实施例2所述,所不同的是:

[0112] 步骤(1)中,PBASE的浓度为8mM,注入50mM探针DNA P20水溶液到石墨烯表面,室温下孵育8h;

[0113] 步骤(2)中,待测DNA为完全匹配DNA(T20)和四种不同的单个位点失配DNA(序列:3'-CTCAACGATGTCTGGAAGCC-5',编号:T20(TC01);序列:3'-CTCAACGATGTCTGGACGCA-5',编号:T20(TC04);序列:3'-CTCAACGCTGTCTGGAAGCA-5',编号:T20(TC13);序列:3'-CTCCACGATGTCTGGAAGCA-5',编号:T20(TC17));5种待测DNA样品溶液的浓度皆为5nM;

[0114] 步骤(3)同实施例2,拟合结果如下表所示:

[0115] 表3.P20与完全匹配及不同位点失配杂交作用的动力学参数及平衡常数

[0116]

	$k_a (\times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_d (\times 10^{-4} \text{s}^{-1})$	$K_A (\times 10^9 \text{M}^{-1})$
P20-T20	2.62 (0.14)	1.09 (0.07)	2.40 (0.15)
P20-T20 (TC01)	2.15 (0.15)	1.78 (0.08)	1.21 (0.16)
P20-T20 (TC04)	1.61 (0.12)	2.19 (0.04)	0.74 (0.14)

P20-T20 (TC13)	1.39 (0.14)	2.83 (0.07)	0.49 (0.13)
P20-T20 (TC17)	1.82 (0.16)	1.98 (0.09)	0.92 (0.17)

[0117] 本实施例所测量的DNA不同位点失配DNA杂交过程的动力学传感图如图12所示。

[0118] 实施例5:利用实施例1的装置区分不同类型的突变。

[0119] 如实施例2所述,所不同的是:

[0120] 步骤(1)中,PBASE的浓度为5mM,5'端氨基化的探针DNA(序列:H2N-(CH₂)₆-5'-TTTTTTCGGCCGCACACGTCC-3';编号:P15);

[0121] 步骤(2)中,待测DNA有两种,一种从5'端第13个位点由T突变为C(序列:3'-TGGTCCGCCGGCGTGTGCAGGAGGTA-5',编号:T26(TC13)),另一种从5'端第13个位点由T突变为G(序列:3'-TGGTCCGCCGGCGGGTGTGCAGGAGGTA-5',编号:T26(TG13));两种待测DNA样品溶液的浓度皆为5nM;

[0122] 步骤(3)同实施例2,拟合结果如下表所示:

[0123] 表4.P15-T26(TG13) T26、P15-T26(TC13)杂交作用的动力学参数及平衡常数

[0124]

	$k_a (\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$k_d (\times 10^{-4} s^{-1})$	$K_A (\times 10^9 M^{-1})$
P26-T26 (TG13)	1.11	5.07	0.22
P26-T26 (TC13)	1.04	8.53	0.12

[0125] 本实施例测得的不同类型突变动力学传感图如图13所示。

[0126] 实施例6:通过再生恢复实施例1的传感装置的检测能力。

[0127] 如实施例2所述,所不同的是,在实施例2完成后,恢复传感装置的检测能力,包括以下步骤:

[0128] (1)用注射泵将15mM NaOH通过微流控芯片注入到功能化的石墨烯表面,保持恒定的30 μ l/min注入速度,注入时长60s,解旋P20-T20;

[0129] (2)用注射泵将0.01 \times PBS缓冲液通过微流控芯片注入到功能化的石墨烯表面,洗去待测DNA T20,恢复传感装置P20的特异性结合能力,检测结果如图14所示。

[0130] 实施例7:通过再生恢复实施例1的传感装置的检测能力。

[0131] 如实施例2所述,所不同的是,在实施例2完成后,恢复传感装置的重新检测新分子能力,包括以下步骤:

[0132] (1)用注射泵将80mM NaOH通过微流控芯片注入到功能化的石墨烯表面,保持恒定的30 μ l/min注入速度,注入时长150s,将PBASE、待测DNA T20、探针DNA P20同时从石墨烯表面解脱;

[0133] (2)用注射泵将0.01 \times PBS缓冲液通过微流控芯片注入到功能化的石墨烯表面,PBASE、待测DNA T20、探针DNA P20从石墨烯表面同时洗去;

[0134] (3)重复实施例2中步骤(1),重新链接探针DNA P20到石墨烯表面,恢复传感装置P20的特异性结合能力。

[0135] 上述虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对发明保护范围的限制,所属领域技术人员应该明白,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围内。

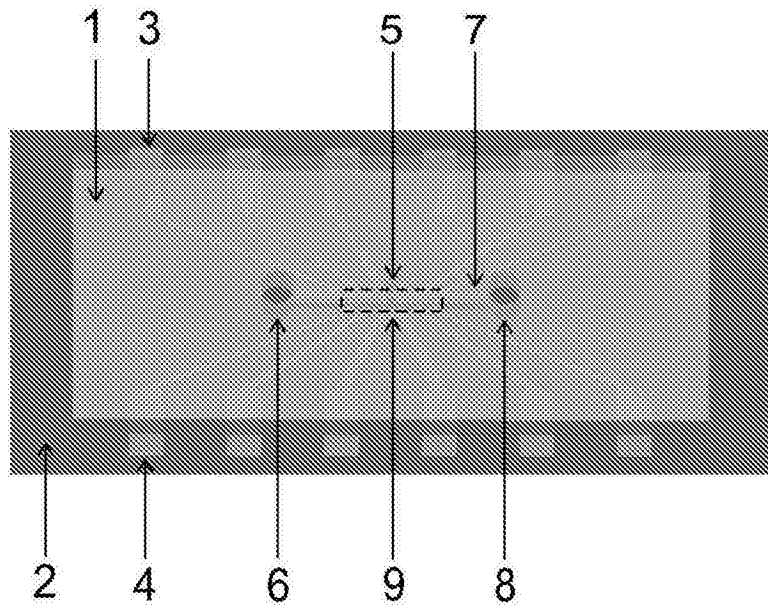


图1

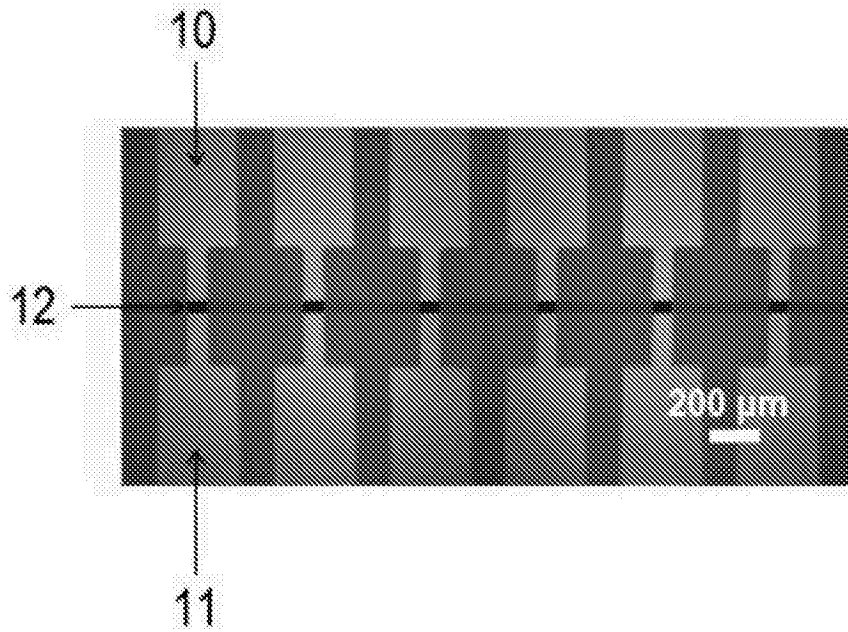


图2

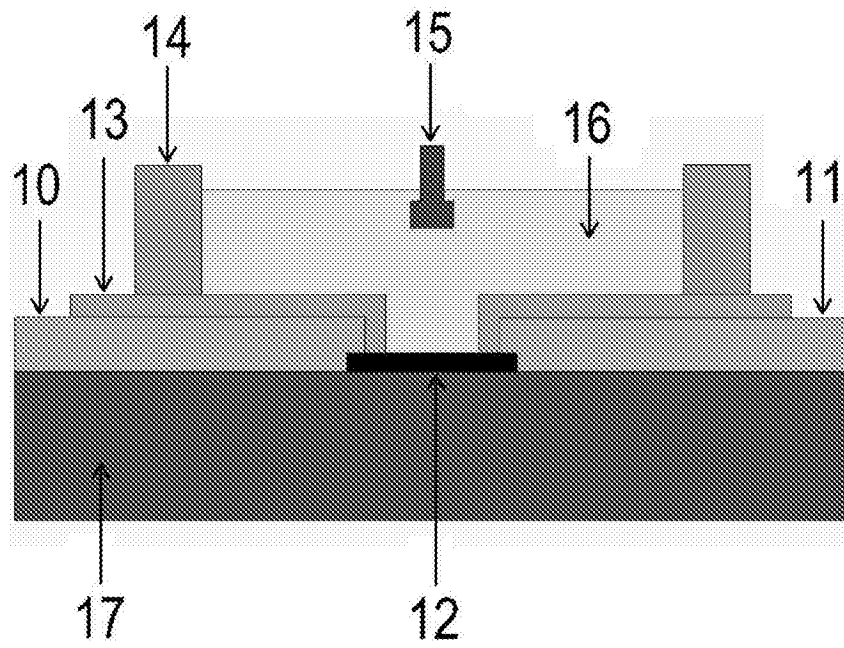


图3

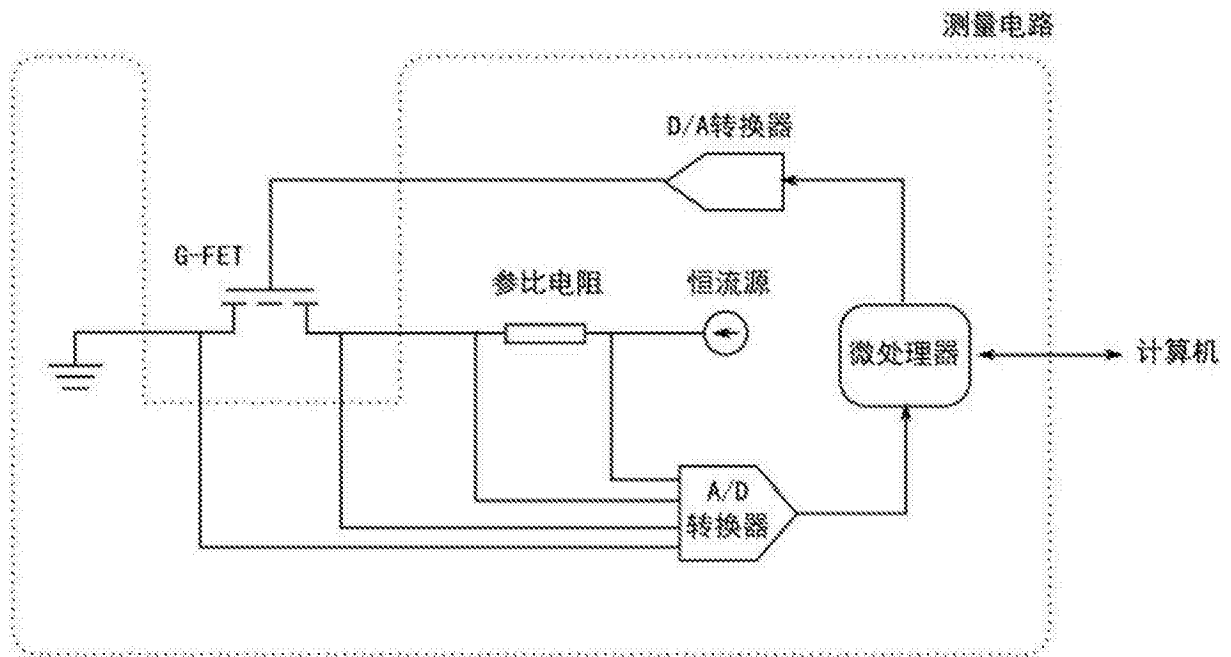


图4

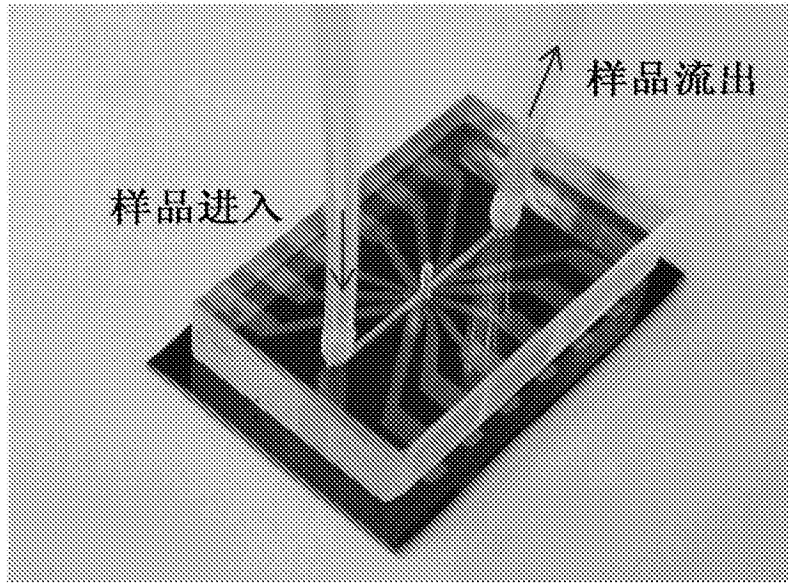


图5

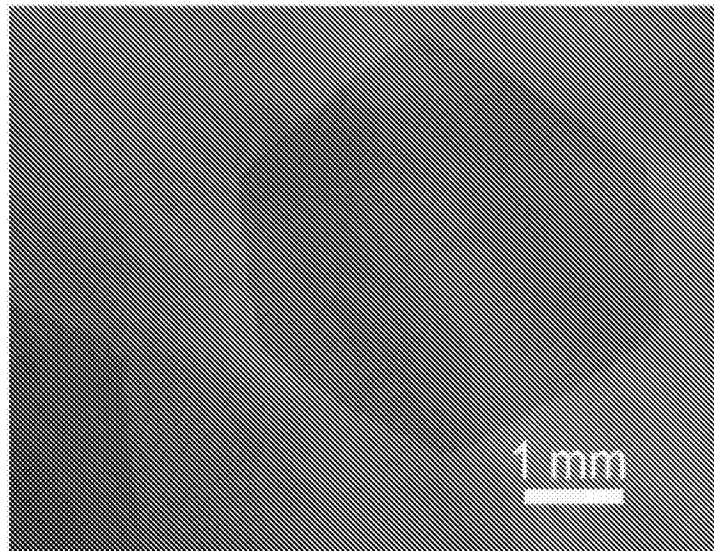


图6

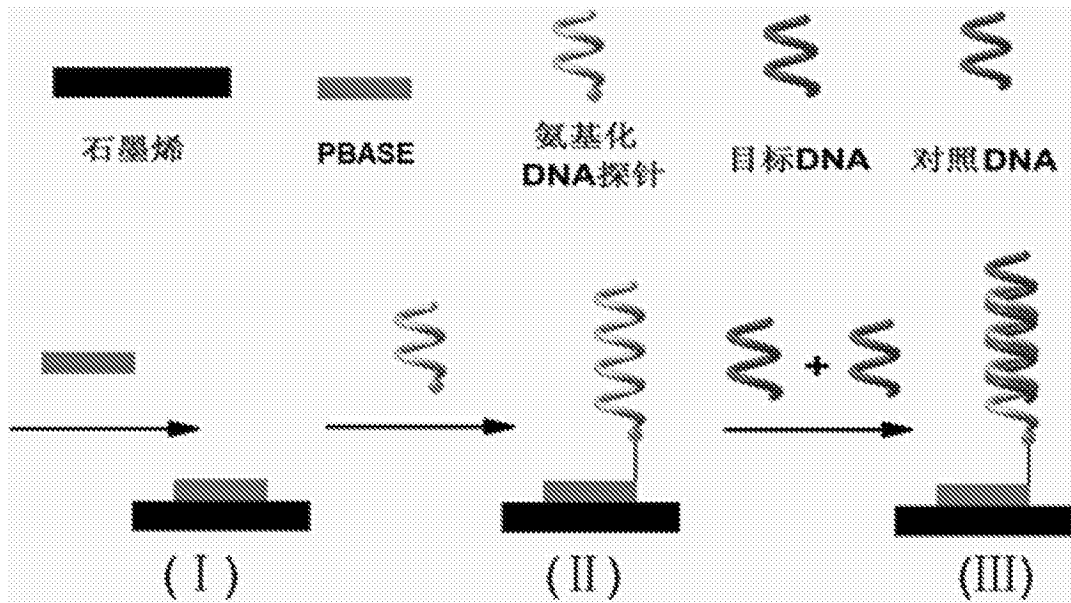


图7

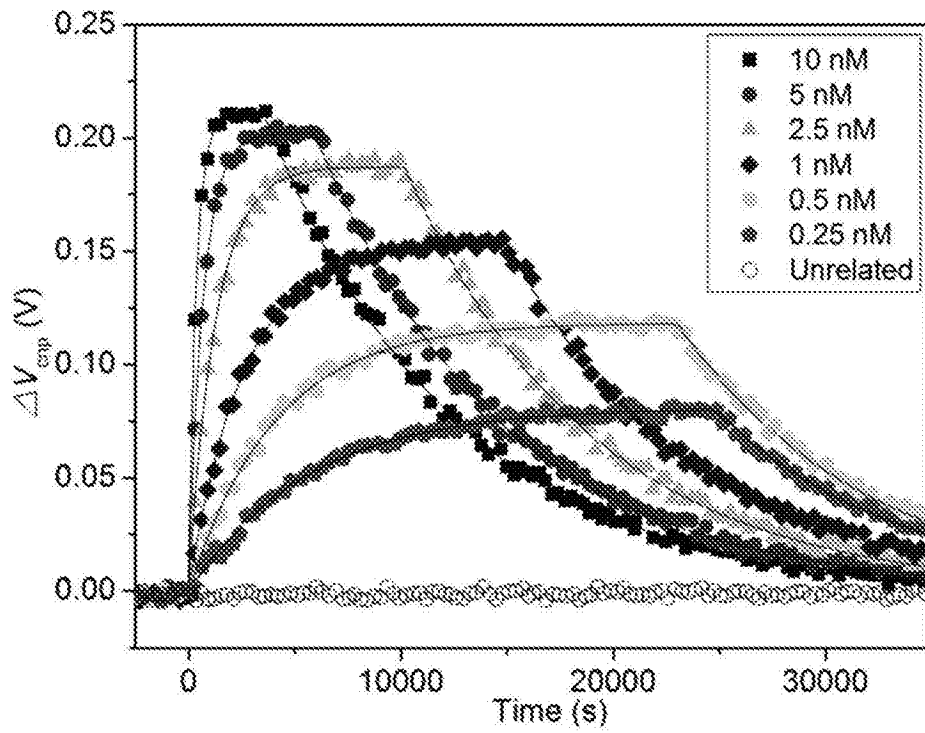


图8

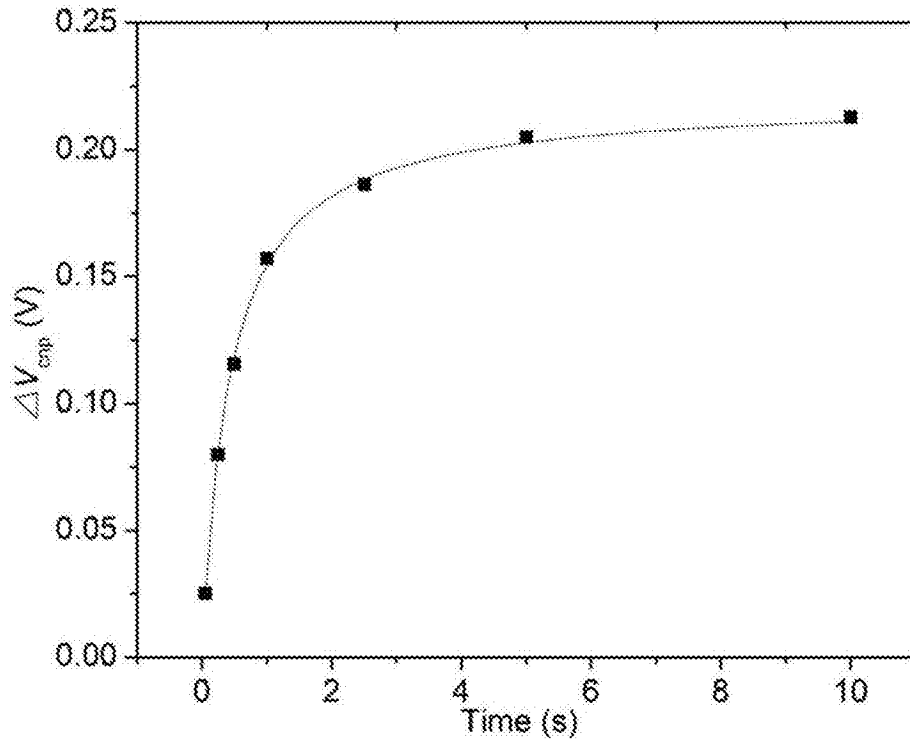


图9

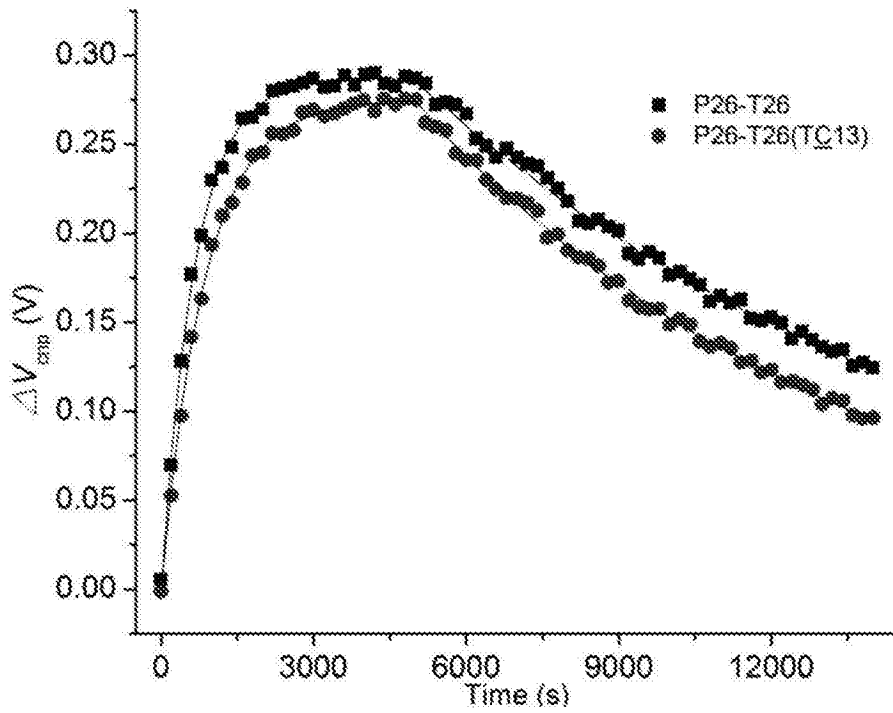


图10

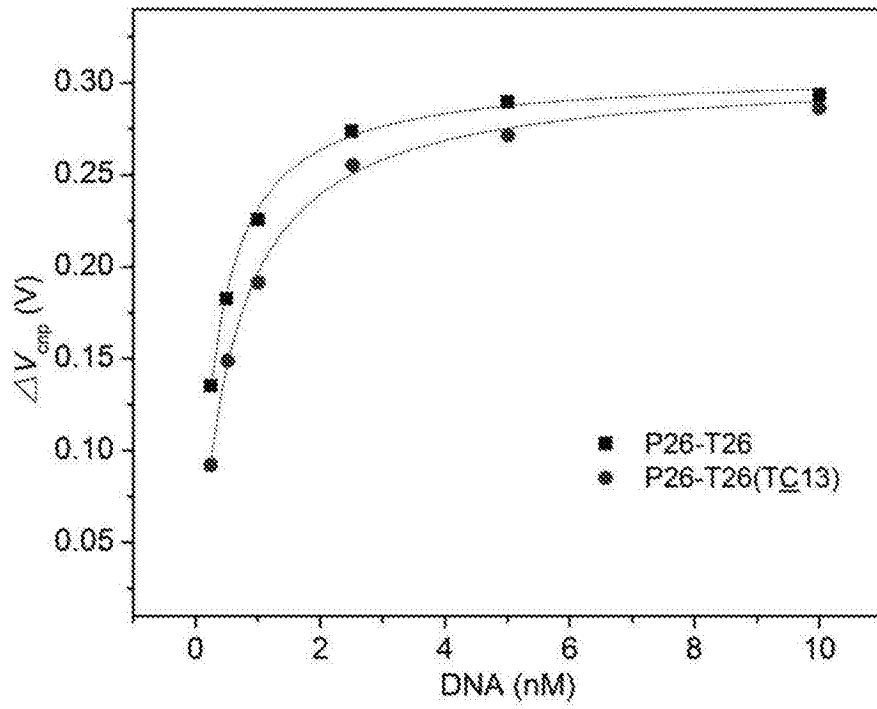


图11

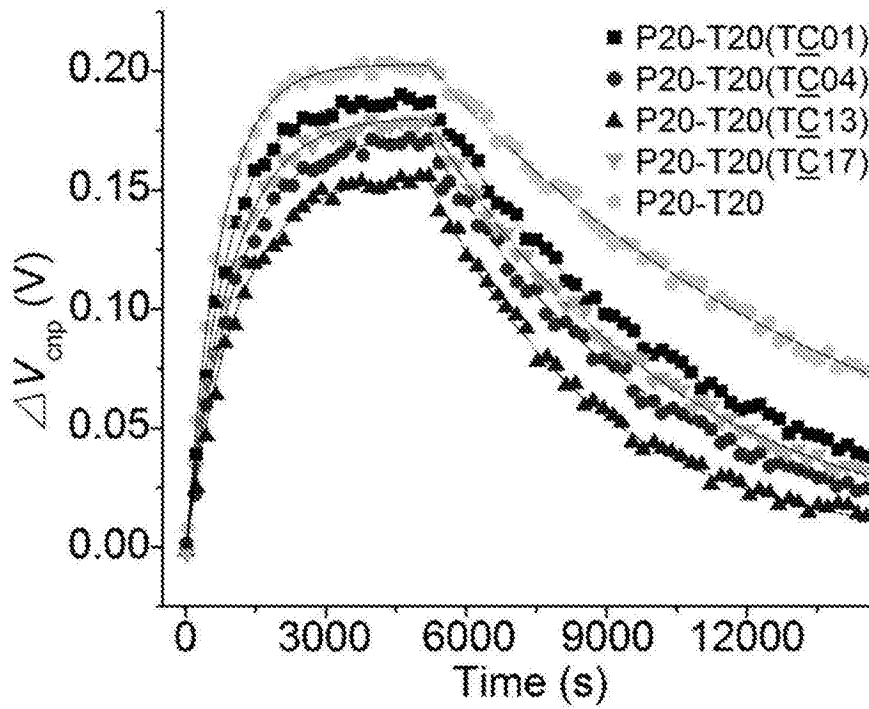


图12

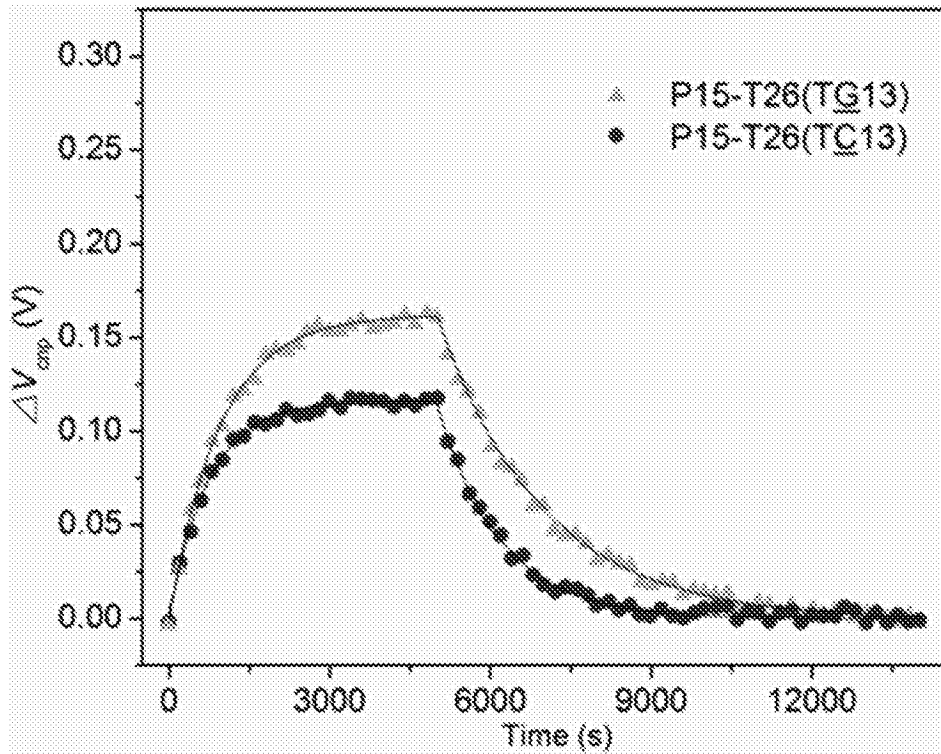


图13

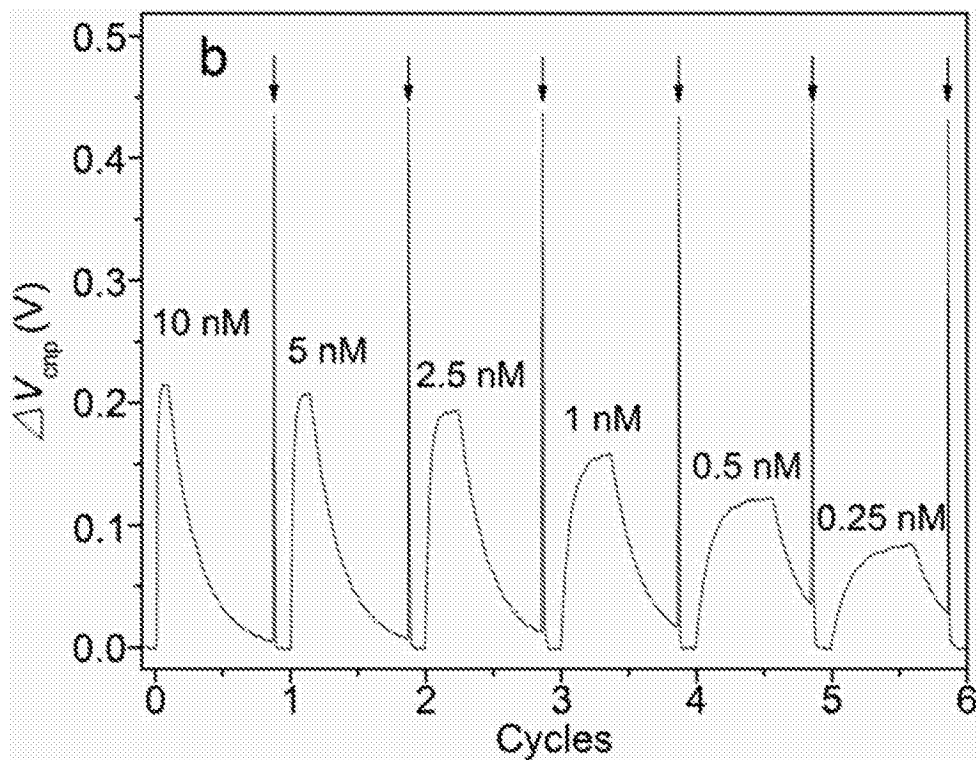


图14