



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112816679 B

(45) 授权公告日 2024.05.28

(21) 申请号 202010965386.5
 (22) 申请日 2016.02.04
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 112816679 A
 (43) 申请公布日 2021.05.18
 (30) 优先权数据
 62/112630 2015.02.05 US
 (62) 分案原申请数据
 201680019980.7 2016.02.04
 (73) 专利权人 哈佛大学校长及研究员协会
 地址 美国马萨诸塞州
 (72) 发明人 谢平
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
 专利代理师 杨思捷
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/487 (2006.01)
 G01N 27/414 (2006.01)

G01N 27/416 (2006.01)
 G01N 27/447 (2006.01)
 C12M 1/34 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102905788 A, 2013.01.30
 CN 103842519 A, 2014.06.04
 CN 104011866 A, 2014.08.27
 CN 104066850 A, 2014.09.24
 JP 2014190891 A, 2014.10.06
 US 2006063171 A1, 2006.03.23
 US 2006292041 A1, 2006.12.28
 US 2007178507 A1, 2007.08.02
 US 2010243449 A1, 2010.09.30
 US 2010331194 A1, 2010.12.30
 US 2013240359 A1, 2013.09.19
 US 2013265031 A1, 2013.10.10
 US 2014183040 A1, 2014.07.03
 US 2014326604 A1, 2014.11.06

审查员 葛佳佳

权利要求书2页 说明书25页 附图38页

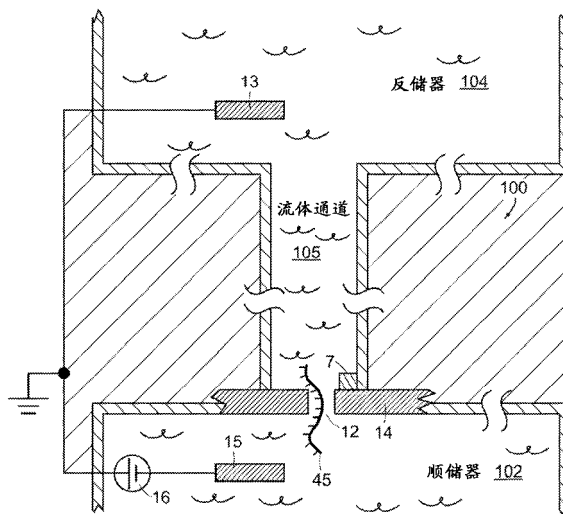
(54) 发明名称

一种用于感测分子穿过纳米孔的移位的方法

(57) 摘要

本发明涉及包括流体通道的纳米孔感测器。本发明提供一种纳米孔感测器(3),该感测器包括布置在支持结构(14)中的纳米孔(12)。流体通道(105)布置在第一流体储器(104)和纳米孔(12)之间,以通过流体通道(105)使第一流体储器(104)流体连接到纳米孔(12)。流体通道(105)具有大于通道宽度的通道长度。流体通道因此为微通道形式。第二流体储器(102)流体连接到纳米孔(12),纳米孔(12)提供流体通道(105)和第二储器(102)之间的流体连通。连接电极(13,15),以跨纳米孔(12)施加电位差。至少一个电转换元件(7)以连接布置在纳米孔感测器(3)中,以测定流体通道(105)局部的电位。电转换元件(7)

作为场效应晶体管、单电子晶体管或对接近纳米孔(12)的电位敏感的荧光染料提供。第一流体和第二流体储器(102,105)之间的离子浓度比可以调节以便改进接近纳米孔(12)感测的电位。



1. 一种用于感测分子穿过纳米孔的移位的方法,包括:

将第一流体储器中的第一流体溶液中的至少一种分子引导至纳米孔的入口,所述第一流体储器被设置成与纳米孔的入口流体连接;

将所述第一流体溶液中的所述分子移位通过所述纳米孔,从纳米孔出口离开,并且随后通过被设置成与所述纳米孔出口流体连接的流体通道,所述流体通道包括通道长度,所述通道长度具有的流体通道流体电阻 R_{pp} 为纳米孔流体电阻 R_{pl} 的至少10%而不大于纳米孔流体电阻 R_{pl} 的10倍,以及具有通道宽度,所述通道宽度大于所述纳米孔的直径而小于所述通道长度;将所述分子引导至在第二流体储器中的第二流体溶液,所述第二流体储器被设置成与所述流体通道流体连接;以及

在所述分子穿过纳米孔的移位期间感测所述流体通道的局部电位,以感测所述分子的移位。

2. 权利要求1所述的方法,其中对分子进行移位包括对选自DNA、RNA、PNA、核苷、寡核苷酸、蛋白和聚合物的至少一种分子进行移位。

3. 权利要求1所述的方法,其产生表示所述感测的流体通道的局部电位的信号,并测量所产生的信号。

4. 权利要求1所述的方法,其中感测所述流体通道局部的电位包括利用电转换元件产生指示所述流体通道局部的电位的电压。

5. 权利要求1所述的方法,其中感测所述流体通道的局部电位包括用设置在所述流体通道处的电转换元件产生指示所述流体通道的局部电位的信号。

6. 权利要求1所述的方法,进一步包括与设置在所述流体通道处的电转换元件相连的电路产生指示所述流体通道的局部电位的信号。

7. 权利要求1所述的方法,其中感测所述流体通道局部的电位包括显示由晶体管产生的信号。

8. 权利要求1所述的方法,其中感测所述流体通道局部的电位包括测量设置在所述流体通道处的感测电极的电压。

9. 权利要求1所述的方法,其还包括在所述第一流体溶液和所述第二流体溶液之间施加电压,所述电压可操作以使所述分子电泳移位通过所述纳米孔和所述流体通道。

10. 权利要求1所述的方法,其中将至少一个分子移位通过所述纳米孔包括将至少一个分子移位通过蛋白纳米孔。

11. 权利要求1所述的方法,其还包括产生指示分子移位通过所述纳米孔的局部电位信号测定。

12. 权利要求1所述的方法,其还包括基于所感测的流体通道局部的电位产生指示分子移位通过纳米孔的电信号。

13. 权利要求12所述的方法,还包括处理作为时间的函数的指示分子移位的电信号,以确定所述分子穿过所述纳米孔的移位的持续时间。

14. 权利要求12所述的方法,其还包括处理作为时间的函数的指示分子移位的电信号以鉴定所述分子。

15. 权利要求14所述的方法,其中所述分子包括聚合物单元序列;并且其中处理作为时间的函数的指示分子移位的电信号以鉴定所述分子包括确定分子的聚合物单元的序列概

率。

16. 权利要求1所述的方法, 还包括用布置在所述纳米孔的分子马达控制分子穿过所述纳米孔的移位速率。

17. 权利要求1所述的方法, 其中将所述分子移位通过所述纳米孔和所述流体通道包括将所述分子移位通过所述流体通道的横向自身旋绕的横向流体通道部分。

18. 权利要求1所述的方法, 其中使所述分子移位通过所述纳米孔和所述流体通道包括使所述分子移位通过流体通道长度, 所述流体通道长度与纳米孔支持结构上的表面层在同一平面中。

19. 权利要求1所述的方法, 其中将所述分子移位通过所述纳米孔和所述流体通道包括使所述分子移位通过所述流体通道的水平流体通道区段以及使所述分子移位通过所述流体通道的垂直接流体通道区段, 该垂直接流体通道区段相对于所述水平流体通道区段垂直。

20. 权利要求1所述的方法, 其中对分子进行移位包括对选自DNA片段、RNA片段、核苷酸和多肽的至少一种分子进行移位。

21. 权利要求1所述的方法, 其中对分子进行移位包括对至少一种分子进行移位, 其中所述分子是氨基酸。

一种用于感测分子穿过纳米孔的移位的方法

[0001] 本申请是申请号为201680019980.7母案的分案申请。该母案的申请日为2016年2月4日；发明名称为“包括流体通道的纳米孔感测器”。

[0002] 相关申请交叉引用

[0003] 本申请要求2015年2月5日提交的美国临时申请号62/112,630的权益,其全部内容通过引用结合到本文中。

[0004] 关于联邦资助的研究的声明

[0005] 本发明根据NIH授予的合同号5DP10D003900在政府支持下产生。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0006] 本发明一般涉及利用纳米孔感测器的感测系统,更具体地讲,涉及在物质移过纳米孔感测器时感测物质的技术。

背景技术

[0007] 固态纳米孔和生物纳米孔二者正逐渐成为研发低成本、高通量感测系统中重要努力的焦点,这种感测系统可用于感测宽范围物质,包括单分子,例如聚合物分子。基于纳米孔感测的一般方法利用测定通过纳米孔的离子电流,纳米孔提供于高阻两亲膜上,两亲膜在膜两侧上提供的电极之间。由于使分子(例如,聚合物分析物,如DNA)移过纳米孔,通过DNA链的不同核苷酸碱基调节通过纳米孔的离子电流。为了测定聚合物链的序列特征,可测定离子电流变化。为了检测蛋白,也例如在作为W02013/123379公开的国际专利申请PCT/US2013/026414中报告用于检测多核苷酸以外的分析物的纳米孔装置。虽然为了DNA测序已在使用固态纳米孔的研发方法和系统中有相当多的努力,但实现商业化仍有很多挑战。另外,不同纳米孔结构也造成特殊挑战。例如,在使用纳米孔阵列中,其中可测定通过阵列中各纳米孔的离子电流,可在普通电极和在各纳米孔相应相反侧上提供的多个电极之间进行检测。在此,多个电极需要相互电隔离,这限制纳米孔装置的集成密度水平。

[0008] 在一些方面,生物纳米孔相对于固态纳米孔是有利的,原因是它们提供不变且可再现的物理孔。然而,其中提供它们的两亲膜一般易碎,且会经受降解,这提供通过膜的离子泄漏通道。分析物移位通过生物纳米孔的速度可用酶控制。多核苷酸的酶辅助移位一般为约30个碱基/秒。为了提高分析物的通量率,高得多的移位速度合乎需要,但发现,感测信号测量一般可能存在问题。

[0009] 为了避免由用于纳米孔感测的离子电流测定方法造成的技术挑战,已提出数种替代纳米孔感测方法。这些替代方法一般涉及利用整合有纳米孔的电子感测器记录相对局部纳米孔信号的布置。这些纳米孔感测方法包括例如跨纳米孔测量电容耦合和通过移过纳米孔的物质测量穿隧电流。虽然提供引人关注的供选感测技术,但这些电容耦合和穿隧电流测量技术仍未对用于纳米孔感测的常规离子电流检测技术改善,离子电流检测技术仍受到信号放大和信号带宽问题挑战。

发明内容

[0010] 本发明提供一种纳米孔感测器,通过测定在感测器中提供的流体通道的局部电位,该感测器克服上述常规纳米孔感测器和纳米孔感测技术的限制。纳米孔感测器包括布置在支持结构中的纳米孔。流体通道布置在第一流体储器和纳米孔之间,以通过流体通道使第一流体储器以流体连接到纳米孔。流体通道具有大于通道宽度的通道长度。第二流体储器以流体连接到纳米孔,纳米孔提供流体通道和第二储器之间的流体连通。连接电极,以跨纳米孔施加电位差。利用连接在纳米孔感测器中布置至少一个电转换元件,以测定流体通道局部的电位。

[0011] 这种纳米孔感测器结构使得能够通过转换元件感测局部电位,以提供高灵敏度、高带宽和与离子电流成比例的局部大信号。因此,可用纳米孔感测器以很高集成密度和分析物通量实现纳米孔感测应用,例如DNA测序。通过以下描述和附图及权利要求,本发明的其它特征和优点将显而易见。

附图说明

[0012] 图1A为用于测定局部电位的第一实施例纳米孔感测器结构的示意电路图;

[0013] 图1B为图1A的纳米孔感测器结构的实施例晶体管实施方式的电路图;

[0014] 图1C为用于测定局部电位的第二实施例纳米孔感测器结构的示意电路图;

[0015] 图1D为图1C的纳米孔感测器结构的实施例晶体管实施方式的电路图;

[0016] 图1E为图1A和1C的感测器结构的组合的实施例晶体管实施方式的电路图;

[0017] 图1F为用于测定局部电位的纳米孔感测器结构的单电子晶体管实施方式的示意平面图;

[0018] 图1G为用于测定局部电位的纳米孔感测器结构的量子点接触实施方式的示意平面图;

[0019] 图1H为布置用于测定局部电位的蛋白纳米孔感测器结构的实施方式的包括荧光染料的脂质双层的示意侧视图;

[0020] 图2A为用于测定局部电位的纳米孔感测器结构的示意图和相应电路元件;

[0021] 图2B为图1B的纳米孔感测器晶体管实施方式的电路图;

[0022] 图3A为如限定用于感测器定量分析的测定局部电位的纳米孔感测器结构的几何特征的示意侧视图;

[0023] 图3B-3C分别为对于其中顺和反储器包括相等离子浓度的流体溶液的结构和对于其中顺储器(*cisreservoir*)和反储器(*transreservoir*)包括不相等离子浓度的流体溶液的结构,用于测定局部电位的纳米孔感测器的纳米孔中电位在此作为从纳米孔进入顺储器的距离的函数标绘的绘图;

[0024] 图3D-3E分别为相当于图3A-3B的电位的绘图的用于测定局部电位的纳米孔感测器的纳米孔中电场的绘图;

[0025] 图4A为对于50nm厚纳米孔薄膜和1V跨膜电压(TMV)结构在dsDNA分子移位通过纳米孔时对于电泳物质移位到纳米孔中的电位变化,作为纳米孔构造用于局部电位测定时低于10nm的不同纳米孔直径的 $C_{顺}/C_{反}$ 离子浓度比的函数的绘图;

[0026] 图4B为对于图4A绘图的条件在1V TMV下10nm直径纳米孔在反储器中的电位变化

的绘图；

[0027] 图4C为对于构造用于局部电位测定的纳米孔感测器的噪声源和信号作为记录带宽的函数的绘图；

[0028] 图4D为构造用于局部电位测定的纳米孔感测器的带宽作为一定范围储器溶液浓度比的顺室溶液浓度的函数的绘图；

[0029] 图4E为构造用于局部电位测定的纳米孔中从纳米孔部位的信号衰减长度作为顺和反储器溶液浓度比的函数的绘图；

[0030] 图5为包括在第一储器(在此为反储器)和支持结构中纳米孔之间连接的流体通道的纳米孔感测器的示意图；

[0031] 图6为图5的纳米孔感测器的电路模型；

[0032] 图7为测定跨导信号与最大可达到跨导信号之比作为流体通道电阻和纳米孔电阻之间之比的函数的绘图；

[0033] 图8为具有几何参数定义的图5的纳米孔感测器的示意侧视图；

[0034] 图9为图5的感测器中流体通道电阻与纳米孔电阻之比作为选择感测器尺寸的流体通道直径与流体通道长度之比的函数的绘图；

[0035] 图10为测定跨导信号与最大可达到跨导信号之比作为选择感测器尺寸的流体通道直径与流体通道长度之比的函数的绘图；

[0036] 图11为第一流体通道结构的示意侧视图；

[0037] 图12为对于纳米孔在支持结构上布置的流体通道的示意侧视图；

[0038] 图13为阳极化氧化铝流体通道结构的示意侧视图；

[0039] 图14为横向流体通道结构的示意侧视图；

[0040] 图15A-15B为实施例横向流体通道结构的示意俯视图；

[0041] 图16A-16E为布置有用于进行局部电位测定的元件的流体通道结构的示意侧视图；

[0042] 图17为构造用于局部电位测定的具有在薄膜上布置的纳米线FET的纳米孔感测器的示意图；

[0043] 图18为图17的纳米孔感测器结构的一个示例实施方式的透视图；

[0044] 图19A-19B分别为构造用于局部电位测定的具有在石墨烯薄膜上布置的纳米线FET的纳米孔感测器的示意图和该纳米孔感测器的示例实施方式的平面图；

[0045] 图20A-20B分别为构造用于局部电位测定的具有在纳米线FET上布置的石墨烯层的纳米孔感测器的示意图和该纳米孔感测器的示例实施方式的平面图；

[0046] 图21A-21B分别为构造用于局部电位测定的具有石墨烯薄膜的纳米孔感测器的示意图和该纳米孔感测器的示例实施方式的平面图；

[0047] 图22A-22D为对于构造用于局部电位测定的纳米孔感测器中纳米线的纳米孔的示例位置的示意平面图；

[0048] 图23为在纳米线位置形成纳米孔之前和之后构造用于局部电位测定的纳米孔感测器中纳米线的灵敏度的绘图；

[0049] 图24A分别为对于2V TMV和100:1 顺/反储器溶液浓度比在反储器中进行局部电位测定,在构造用于局部电位测定的纳米孔感测器中DNA移位通过纳米孔时 i) 通过纳米孔

的测定离子电流和ii) 测定纳米线FET电导的绘图;

[0050] 图24B分别为对于2.4V TMV和100:1 顺/反储器溶液浓度比,在反储器中进行局部电位测定,在构造用于局部电位测定的纳米孔感测器中DNA移位通过纳米孔时,i) 通过纳米孔的测定离子电流和ii) 测定纳米线FET电导的绘图;

[0051] 图24C分别为对于0.6V TMV和1:1 顺/反储器溶液浓度比,在反储器中进行局部电位测定,在构造用于局部电位测定的纳米孔感测器中DNA移位通过纳米孔时,i) 通过纳米孔的测定离子电流和ii) 测定纳米线FET电导的绘图;并且

[0052] 图25分别为在构造用于局部电位测定的纳米孔感测器中在DNA移位通过三个感测器中的纳米孔时,i) 通过三个纳米孔共享储器测定的总离子电流,ii) 通过第一纳米孔的测定纳米线FET电导,ii) 通过第二纳米孔的测定纳米线FET电导,和ii) 通过第三纳米孔的测定纳米线FET电导的绘图。

具体实施方式

[0053] 图1A-1E为使局部电位感测方法能够用于纳米孔感测的本文提供的纳米孔感测器结构的示意图。为了讨论清楚,图中所示装置特点未按比例显示。参考图1A,图1A显示纳米孔感测器3,纳米孔感测器3包括支持结构14,例如薄膜,在其中布置纳米孔12。纳米孔12在示意显示为反储器和顺储器的两个流体储器之间的支持结构中构造,使得纳米孔12为顺储器和反储器之间的唯一流体连通通道。一个储器连接到至纳米孔的入口,而另一个储器连接到从纳米孔的出口。在物质移位通过纳米孔的局部电位测定检测的纳米孔感测器操作中,在用于移位通过纳米孔达到两个储器中的另一个的储器之一内的流体溶液中提供一种或多种物质对象,例如分子。对于很多应用,特别对于分子感测应用,分子或其它物质对象可优选在储器之一中在离子流体溶液中提供,并且可在任一个储器中提供。

[0054] 要移位通过纳米孔的物质对象可包括选自例如DNA、DNA片段、RNA、RNA片段、PNA、核苷酸、核苷、寡核苷酸、蛋白、多肽、氨基酸和聚合物的对象。物质对象可包括从标记核苷酸释放的标签。通过聚合酶,可使沿着核酸分子的核苷酸聚合,以产生与至少部分核酸分子互补的核酸链,由此,在聚合期间,从核苷酸的单独核苷酸释放标签,由此释放的标签移过纳米孔,如通过引用结合到本文的WO 2013/191793中所述。

[0055] 纳米孔可作为支持结构中的孔穴、间隙、通道、沟槽、孔或其它孔眼提供,对于适用于关注感测物质对象的相应几何形状,纳米孔具有一定广度,例如直径。为了感测分子移位通过纳米孔,小于约100nm纳米孔可能是优选的,小于10nm、5nm或2nm的纳米孔更优选。如下讨论,1nm纳米孔可能适用于且更优选用于一些分子感测应用。

[0056] 纳米孔感测器的储器或其它组件可构造成提供驱动力,用于物质对象(例如分子)移向纳米孔或通过纳米孔从一个储器移到另一个储器。例如,可在具有电压和电流元件16,18的电路中提供电极13,15,以在储器之间提供电泳力,用于将溶液中的物质朝向纳米孔或通过纳米孔从一个储器电泳驱动到另一个储器。为了能够电泳驱动物质,储器的流体溶液可提供为具有pH和适用于溶液中物质的其它特征的电导离子溶液。由此,电路可通过纳米孔利用图中所示电极13,15与储器溶液串联连接,从而跨纳米孔在溶液之间提供电压偏压。物质通过纳米孔的移位和移位速率控制可用供选技术进行,例如酶分子马达。

[0057] 除了为施加电压的驱动力之外或作为其替代,可用跨孔的压力梯度将分子带向纳

米孔和/或使其通过纳米孔。通过使用物理压力或化学压力(例如渗透压),可产生该压力梯度。渗透压可从跨顺室和反室的浓度差产生。通过具有渗透活性剂浓度梯度,例如盐、聚乙二醇(PEG)或甘油,可产生渗透压。

[0058] 如图1A中所示,可在纳米孔感测器中提供转换元件7,转换元件7感测元件部位局部的电位,并显示指示该局部电位的特征。电连接,例如装置或装置的区域和/或电路、线或感测装置和/或电路部位局部电位的电路元件的组合,可提供为转换元件7,以显示指示局部电位的信号。电位感测的位置可在储器中,或者在支持结构的表面上,或纳米孔感测器内的其它位置,如以下详述。

[0059] 如图1B中所示,可提供包括例如晶体管装置22的电路20,晶体管装置22具有源极S、漏极D和通道区域24。在此实例中,通道区域24物理布置在纳米孔感测器环境中的位置,以进行局部电位测定。晶体管通道区域24的这个物理位置可在访问局部电位的任何方便和适合部位。

[0060] 在图1A-1B的布置中,电位感测电路在反储器局部布置,以在纳米孔12的反储器侧提供测定反储器局部的电位的晶体管或其它装置。或者,如图1C中所示,可在纳米孔的顺储器侧布置电转换元件7,例如电位感测装置或电路。在此,如图1D中所示,可提供电路20,电路20包括在纳米孔12的顺储器侧的晶体管24或测定顺储器局部的电位的其它装置。

[0061] 在另一个供选布置中,如图1E中所述,可包括两个或更多个转换元件,并具有连接到转换元件例如晶体管22a、22b的电路20a、20b等,转换元件在纳米孔感测器系统中在两个或更多个位置感测电位,例如纳米孔支持结构各侧。根据电位感测电路的物理实施方式,可由此用此布置测定在纳米孔薄膜14两侧的电位。这是其中能够测定纳米孔感测器中两个部位之间局部电位差的示例结构。因此,术语“测定局部电位”旨在指在纳米孔感测器中单一部位的电位,在两个或更多个部位之间的局部电位差或总和,以及指在纳米孔感测器结构中两个或更多个部位的局部电位。

[0062] 局部电位测定可通过任何适合装置和/或电路或其它转换元件进行,包括生物或其它非固态转换元件,且不限于上述晶体管实施方式。如图1F中所示,可在支持结构14上提供构造成单电子晶体管(SET)电路27的转换元件。在支持结构上布置SET的源极S和漏极D区域,从而提供SET 27的穿隧屏障。在所得量子点系统中,通过SET 27的电导取决于SET相对于源极S和漏极D费米能级的能级。利用邻近SET的纳米孔12,SET的电位和相应能级随物质对象移位通过纳米孔而变化,这改变SET电路的电导。

[0063] 另外,如图1G中所示,可在支持结构14上提供用于进行局部电位测定的量子点接触(QPC)系统29。在该系统中,提供电导区域31,形成源极S和漏极D,通过在纳米孔12部位很薄电导通道区连接的区域。通道区域足够薄,以使垂直于通道区域的电子载体颗粒能态量子化。随着物质对象移位通过纳米孔,围绕QPC的局部电位从而薄电导通道区域内的费米能级改变,导致低于费米能级的量子化态数改变,QPC电导也相应改变。

[0064] 纳米线FET也可布置在纳米孔部位。纳米线可由任何适合电导或半导体材料形成,包括富勒烯结构和半导体。本文所用术语“纳米线”指特征在于与从纳米孔部位测定的信号衰减长度相容的宽度的电导通道。通道宽度优选在与衰减长度相同的数量级,并且可以更大。纳米线可由在选择储器溶液中稳定的任何半导体材料制成。

[0065] 纳米孔感测器不限于具有固态电压感测装置的固态纳米孔结构。也可利用生物纳

米孔和电位感测布置,例如,利用蛋白纳米孔或其它适合结构。如图1H中所示,可提供两亲层31,在其中布置蛋白纳米孔33。可在脂质双层中提供电压敏感染料作为电转换元件,例如,荧光直接染料37。利用这种布置,在物质对象例如分子移位通过蛋白纳米孔时,跨两亲层的压降变化,并通过改变电压调节染料的荧光。光学检测或感测染料荧光和荧光的变化提供在纳米孔电位的感测。可用光学显微或其它常规布置进行此电位测定,作为从纳米孔感测器的光学输出信号。这种两亲层纳米孔感测器是基于在纳米孔系统中的部位感测局部电位的生物纳米孔感测器的实例。关于纳米孔移位检测的局部电位测定方法不限于具体固态或生物结构,并且可应用于任何适合纳米孔结构。

[0066] 支持结构可由有机和无机材料之一或二者形成,包括但不限于微电子材料,无论是电导、半电导或电绝缘,包括例如II-IV和III-V材料、氧化物和氮化物,例如 Si_3N_4 、 Al_2O_3 和 SiO_2 ;有机和无机聚合物,如聚酰胺、塑料(例如Teflon®)或弹性体(如双组分加成-固化硅橡胶)和玻璃。固态支持结构可由单原子层形成,例如石墨烯,或仅数原子厚的层,如美国专利8,698,481和美国专利申请公布2014/174927中所公开,两专利通过引用结合到本文中。可包括多于一个支持层材料,例如多于一个石墨烯层,如美国专利申请公布2013/309776中所公开,所述专利通过引用结合到本文中。适合氮化硅薄膜公开于美国专利6,627,067,支持结构可化学官能化,如美国专利申请公布2011/053284中所公开,两专利通过引用结合到本文中。

[0067] 对于选择的支持结构材料组成、厚度和布置,可用任何适合方法在支持结构中产生纳米孔。例如,为了产生纳米孔,可利用电子束铣削、离子束铣削、用能量束材料雕刻、干蚀刻、湿化学或电化学蚀刻或其它方法,如美国专利申请公布2014/0262820、美国专利申请公布2012/0234679、美国专利8,470,408、美国专利8,092,697、美国专利6,783,643和美国专利8,206,568中所述,所有专利通过引用结合到本文中。另外,可利用挤出、自组装、在相对较大孔的侧壁上材料沉积或其它纳米孔形成方法。

[0068] 作为提供完全固态纳米孔的替代,可在固态孔内提供生物纳米孔。这种结构例如公开于美国专利号8,828,211,所述专利通过引用结合到本文中。另外,生物纳米孔可以为跨膜蛋白孔。生物孔可以为天然产生孔,或者可以为突变孔。典型孔描述于美国专利申请号2012/1007802,也描述于Stoddart D等人, Proc Natl Acad Sci, 12;106(19):7702-7, Stoddart D等人, Angew Chem Int Ed Engl. 2010;49(3):556-9, Stoddart D等人, Nano Lett. 2010 Sep 8;10(9):3633-7, Butler TZ等人, Proc Natl Acad Sci 2008;105(52):20647-52, 美国专利申请公布2014/186823和W02013/153359,均通过引用结合到本文中。孔可以为均低聚,即,从相同单体得到。孔可以为杂低聚,即,在至少一种单体不同于另一种单体时。孔可以为DNA折纸孔,如通过引用结合到本文的Langecker等人, Science, 2012; 338:932-936所述。

[0069] 在一个实施方案中,可在两亲层内提供孔。两亲层为从具有亲水和亲油两种性质的两亲分子形成的层,例如磷脂。两亲层可以为单层或双层,且该层选自脂质双层或非天然脂质双层。双层可以是合成的,如Kunitake T., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31(1992) 709-726所公开。两亲层可以为嵌段共聚物,如通过引用结合到本文的Gonzalez-Perez等人, Langmuir, 2009, 25, 10447-10450和美国专利号6,723,814中所公开。聚合物可以为例如PMOXA-PDMS-PMOXA三嵌段共聚物。

[0070] 参考图2A,可在感测物质移位通过纳米孔的方法中利用在纳米孔感测器中测定在一个或多个部位局部电位的任何这些支持结构、纳米孔和电结构。为了解释这种感测的原理,有益将纳米孔感测器模型化为电路35,电路35包括相当于感测器物理元件的电组件,如图2A中所示。顺储器和反储器可分别用特征流体接入电阻 $R_{反}$ 36、 $R_{顺}$ 38模型化。对于此分析,该接入电阻定义为纳米孔部位局部的储器溶液而非远离纳米孔的自体溶液的流体电阻。纳米孔可用特征纳米孔溶液电阻 $R_{孔}$ 40模型化,即,通过其中布置纳米孔的支持结构的两侧之间的纳米孔长度的溶液的流体电阻。纳米孔也可用特征电容量 $C_{孔}$ 模型化,其为其中布置纳米孔的薄膜或其它支持结构的功能。两个室的接入电阻和纳米孔溶液电阻都是变量。

[0071] 在其中没有物质移位通过纳米孔的纳米孔感测器起始条件下,纳米孔可由以上所给的溶液电阻 $R_{孔}$ 表征,两个流体储器可分别由反储器和顺储器的接入电阻 $R_{反}$ 和 $R_{顺}$ 表征。因此,在物质对象(例如生物分子45)移过纳米孔12时,如图2A中所示,纳米孔的溶液电阻 $R_{孔}$ 和各储器的接入电阻 $R_{反}$ 和 $R_{顺}$ 改变,因为纳米孔中的分子至少部分堵塞通过纳米孔长度的通道,从而改变纳米孔的有效直径。在如此堵塞时,纳米孔的流体溶液电阻和两个储器的接入电阻均增加高于纳米孔中不存在分子时的纳米孔电阻和两个储器的接入电阻。

[0072] 物质对象部分堵塞纳米孔有差别地影响纳米孔溶液电阻和储器接入电阻,如下详述解释。因此,移位物质部分堵塞纳米孔导致在纳米孔和顺和反储器溶液之间发生电压的相应再分布,因此,遍布纳米孔感测器部位的电位相应调节。由此,在图2A中标为A和B的两个部位的局部电位相应随纳米孔溶液电阻的这种变化和储器溶液和纳米孔之间的电压再分布而变化。由此,在这些部位中任一个或在纳米孔感测器结构的另一部位的电位测定或在两个或更多个部位之间局部电位差的测定指示分子移位通过纳米孔。

[0073] 通过在纳米孔感测器中布置的电转换元件,可感测在选择纳米孔感测器部位的局部电位和在此电位的变化。例如,晶体管装置中电导通道的电导变化可提供电位测定。因此,可用晶体管通道电导作为晶体管通道物理位置局部电位的直接指示。图1A-1B的纳米孔感测器布置相当于在图2A的电路35中部位A的局部电位测定。图1C-1D的纳米孔感测器布置相当于在图2A的电路35中部位B的局部电位测定。图1E的纳米孔感测器布置相当于在图2A的电路35中部位A和B两个部位的局部电位测定,并且能够测定在那两个部位的电位差。

[0074] 图1B的示例结构相当的电路显示于图2B中。在此分别显示顺储器和反储器的接入电阻 $R_{顺}$ 、 $R_{反}$,和纳米孔的流体溶液电阻 $R_{孔}$ 。测定局部电位的电转换元件的位置,例如晶体管22的通道,在此位于图2A中的部位A,从而提供在纳米孔反储器侧的反储器的局部电位指示。利用这种布置,在物质对象例如分子移位通过纳米孔时,可关于电位变化(相当于纳米孔状态变化)和纳米孔中一种或多种对象的存在或不存在监测电位测定电路输出信号。

[0075] 这种分析可应用于其中提供局部电转换元件的任何纳米孔感测器。分析不限于FET和上述其它实施方式,可应用于任何转换元件的任何适合布置。所需的都是提供电转换元件,例如装置、装置区域、电路或在物质对象移过纳米孔时进行局部电位测定的其它转换元件。

[0076] 为了进一步分析纳米孔感测器系统参数,可使纳米孔感测器模型化,如图3A的示意图中所示。为了能够分析计算,可利用数个假设。首先,可忽略由包含局部电位感测转换元件引起的纳米孔支持结构的几何变化,例如薄膜和纳米孔自身及纳米孔感测器的其它区域,并且可将电位感测转换元件模型化为点电位检测器。假定流体储器包含电导离子溶液。

两个储器溶液规定包括可为不同离子浓度的不同离子浓度。在一个分析中,利用规定用于储器的不同离子浓度,由通过顺/反储器浓度差驱动的稳态扩散确定通过纳米孔系统的离子浓度分布,且假定扩散达到稳态。通过在纳米孔两侧上小半球中缓冲剂浓度分布和电位近似为常数,可作出另一个假设。假定纳米孔感测器处于稳态。在这些条件下,纳米孔感测器的扩散方程给出为:

$$[0077] \quad \begin{cases} \frac{\partial C}{\partial t} = 0 & \text{(对于两个室和在纳米孔内)} \\ r \frac{\partial^2 C(r)}{\partial r^2} + 2 \frac{\partial C(r)}{\partial r} = 0 & \text{(对于两个室)} \\ \frac{\partial C(z)}{\partial z} = \text{常数} & \text{(在纳米孔内)} \end{cases} \quad (1)$$

[0078] 其中C为流体离子浓度,t为时间,r为在储器中从纳米孔测量的点的位置,z为通过纳米孔长度的距离。如果在边界条件下解这些扩散方程,在顺储器中远离纳米孔 $C = C_{\text{顺}}$,在反储器中远离纳米孔 $C = C_{\text{反}}$,流量在纳米孔且对于两个储器相同,且浓度在各储器在纳米孔开口连续,则两个储器和纳米孔的离子浓度可给出为:

$$[0079] \quad \begin{cases} C_c(r) = C_{\text{顺}} - \frac{C_{\text{顺}} - C_{\text{反}}}{4(2l+d)} \frac{d^2}{r} & \text{(顺室)} \\ C_T(r) = C_{\text{反}} - \frac{C_{\text{反}} - C_{\text{顺}}}{4(2l+d)} \frac{d^2}{r} & \text{(反室)} \\ C_p(z) = C_{\text{反}} + \frac{C_{\text{顺}} - C_{\text{反}}}{2(2l+d)} (4z+d) & \text{(纳米孔)} \end{cases} \quad (2)$$

[0080] 在此,l和d分别为纳米孔支持结构的厚度和纳米孔直径。因此,由于离子浓度分布已知,且溶液电导率与浓度成比例,溶液的电导率 σ 给出为:

$$[0081] \quad \sigma = \Sigma \cdot C \quad (3)$$

[0082] 在此, Σ 为溶液的摩尔电导率。假定总电流为I,则利用顺储器电压 V_c 、反储器电压 V_T 和纳米孔电压 V_p ,通过纳米孔感测器的电位降可给出为:

$$[0083] \quad \begin{cases} dV_c(r) = \frac{I dr}{2\pi \Sigma C_c(r) r^2} & \text{(顺室)} \\ dV_T(r) = \frac{-I dr}{2\pi \Sigma C_T(r) r^2} & \text{(反室)} \\ dV_p(r) = \frac{4I dz}{\pi \Sigma C_p(z) d^2} & \text{(纳米孔)} \end{cases} \quad (4)$$

[0084] 如果在边界条件下解这三个方程,规定在顺储器中远离纳米孔,电位等于跨结构或薄膜施加的电压,即,跨膜电压(TMV),以电泳驱使对象通过纳米孔,在反室远离纳米孔,电位为0V,则纳米孔感测器中的电压(即,在顺储器中的电压) $V_c(r)$ 、在反储器中的电压 $V_T(r)$ 和纳米孔中的电压 $V_p(r)$ 给出为:

$$[0085] \begin{cases} V_C(r) = V + \frac{2l(2l+d)}{\pi\Sigma(C_{顺} - C_{反})d^2} \ln\left(1 - \frac{(C_{顺} - C_{反})d^2}{4(2l+d)C_{顺}r}\right) \\ V_T(r) = \frac{2l(2l+d)}{\pi\Sigma(C_{顺} - C_{反})d^2} \ln\left(1 + \frac{(C_{顺} - C_{反})d^2}{4(2l+d)C_{反}r}\right) \\ V_P(r) = \frac{2l(2l+d)}{\pi\Sigma(C_{顺} - C_{反})d^2} \ln\left(\frac{(4l+d)C_{反} + dC_{顺} + 4(C_{顺} - C_{反})z}{2(2l+d)C_{反}}\right) \end{cases} \quad (5)$$

[0086] 由于电位在两个纳米孔开口进入储器都是连续的,且由于施加的总电压为V,则表达(5)可进一步简化为:

$$[0087] \begin{cases} V_C(r) = V + \frac{V}{\ln(C_{顺}/C_{反})} \ln\left(1 - \frac{d^2(1 - C_{反}/C_{顺})}{4(2l+d)r}\right) \\ V_T(r) = \frac{V}{\ln(C_{顺}/C_{反})} \ln\left(1 + \frac{d^2(C_{顺}/C_{反} - 1)}{4(2l+d)r}\right) \\ V_P(r) = \frac{V}{\ln(C_{顺}/C_{反})} \ln\left(\frac{4l+d + dC_{顺}/C_{反} + 4(C_{顺}/C_{反} - 1)z}{2(2l+d)}\right) \end{cases} \quad (6)$$

[0088] 利用此表达,纳米孔内的电场 $E_p(r)$ 可给出为:

$$[0089] E_p(r) = \frac{dV_P(r)}{dz} = \frac{4V(C_{顺}/C_{反} - 1)}{\ln(C_{顺}/C_{反})} \frac{1}{4l+d + dC_{顺}/C_{反} + 4(C_{顺}/C_{反} - 1)z} \quad (7)$$

[0090] 利用此表达,由在纳米孔中存在物质对象(例如分子)减小纳米孔面积A改变电位,可估算在纳米孔反储器侧的电位变化,为:

$$[0091] \delta V_T|_{d/2} = \frac{\partial V_T}{\partial A} \Big|_{d/2} \delta A = \frac{2\delta AV}{\pi \ln(C_{顺}/C_{反}) (2l+d)(d^2(C_{顺}/C_{反} - 1) + 4(2l+d)r)} \Big|_{d/2} \quad (8)$$

$$= \frac{2\delta AV}{\pi \ln(C_{顺}/C_{反}) (2l+d)(d^2(C_{顺}/C_{反} + 1) + 4ld)}$$

[0092] 在此, δA 为分子的横截面面积。基于跨储器和纳米孔的压降的以上表达,可计算纳米孔感测器的电阻,即 $R_{顺}$ 、 $R_{反}$ 和 $R_{孔}$,为:

$$[0093] \begin{cases} R_{顺} = \frac{-2(2l+d)}{\pi\Sigma(C_{顺} - C_{反})d^2} \ln\left(1 - \frac{(C_{顺} - C_{反})d}{2(2l+d)C_{顺}}\right) \\ R_{反} = \frac{2(2l+d)}{\pi\Sigma(C_{顺} - C_{反})d^2} \ln\left(1 + \frac{(C_{顺} - C_{反})d}{2(2l+d)C_{反}}\right) \\ R_{孔} = \frac{2(2l+d)}{\pi\Sigma(C_{顺} - C_{反})d^2} \ln\left(\frac{(4l+d)C_{顺} + dC_{反}}{(4l+d)C_{反} + dC_{顺}}\right) \end{cases} \quad (9)$$

[0094] 因此,纳米孔感测器的总电阻和离子电流给出为:

$$[0095] \quad \begin{cases} R = R_{顺} + R_{反} + R_{孔} = \frac{2(2l+d)}{\pi \Sigma (C_{顺} - C_{反}) d^2} \ln\left(\frac{C_{顺}}{C_{反}}\right) \\ I = V/R = \frac{\pi \Sigma (C_{顺} - C_{反}) d^2 V}{2(2l+d) \ln(C_{顺}/C_{反})} \end{cases} \quad (10)$$

[0096] 用这些表达证明,纳米孔感测器的电性质,具体地讲,感测器中电位的分布,直接取决于顺储器和反储器中流体溶液的离子浓度。具体地讲,由于纳米孔的物质移位,储器溶液浓度比直接影响局部电位的变化幅度。

[0097] 图3B-3E为显示这些条件的纳米孔中电位和电场的绘图。假定顺/反缓冲剂溶液浓度比=1:1,50nm厚氮化物薄膜,薄膜中10nm直径纳米孔,和1V跨膜电压,即,在两个储器中溶液之间施加1V,则在图3B中基于以上表达(6),作为在顺储器中从纳米孔开口距离的函数绘制纳米孔中的电位。在图3C中对其中顺/反缓冲剂溶液浓度比为100:1的条件绘制相同电位。应注意到,在接近较低浓度储器的点,对于未平衡缓冲剂溶液比,在所给纳米孔位置电位增加。

[0098] 图3D为对于平衡缓冲剂溶液比基于以上表达(7)在以上所给条件下纳米孔中电场的绘图。在图3E中对其中顺/反缓冲剂液浓度比为100:1的条件绘制相同电场分布。应注意到,在接近低浓度、较高电阻储器的点,对于未平衡缓冲剂溶液比在所给纳米孔位置电位增加,且电场显著更强。

[0099] 从这一结果发现,利用其中储器溶液均作为相同离子浓度电导离子溶液提供的条件,顺储器的接入电阻 $R_{顺}$ 、反储器的接入电阻 $R_{反}$ 和纳米孔的溶液电阻 $R_{孔}$ 比均固定,且纳米孔电阻比储器接入电阻大得多。但在未平衡离子浓度条件下,具有较低离子浓度的储器具有较大接入电阻,可在纳米孔电阻级,而较高离子浓度储器电阻变得相对可忽略。

[0100] 基于这种相应认识,在此发现,为了使纳米孔感测器中局部电位测定达到最大限度,在一个实施方案中,可提供具有不同离子浓度的离子储器溶液。利用这种未平衡离子浓度布置,优选在包括较低离子浓度的储器中的部位进行局部电位测定。更优选选择较低离子浓度溶液的缓冲剂溶液,以给予与纳米孔电阻相同而比较高离子浓度溶液电阻大得多的数量级的那个储器的接入电阻,例如,至少大于高离子浓度溶液的数量级,以便例如,如果在反储器中进行局部电位测定:

$$[0101] \quad R_t, R_p \gg R_c \quad (11)$$

[0102] 因此,基于这一发现,对于设定纳米孔电阻 R_p 的所给纳米孔直径,优选在一个实施方案中使指定用于局部电位测定的储器的离子溶液缓冲剂浓度减小到那个储器的接入电阻与纳米孔电阻相同数量级所在的水平。这一储器接入电阻不应支配纳米孔感测器电阻,而应在纳米孔电阻级。

[0103] 这一条件可通过纳米孔感测器组件以上述方式电模型化直接定量确定。基于以上表达(8),可对于所给纳米孔感测器参数确定在选择对象纳米孔移位期间电位变化达到最大限度的溶液浓度比。图4A为对于50nm厚纳米孔薄膜和1V TMV结构在dsDNA分子移位通过纳米孔时关于电泳物质移位的表达(8)的绘图。电位变化显示为关于低于10nm不同纳米孔直径 $C_{顺}/C_{反}$ 离子浓度比的函数。从这一绘图发现,对于在此模型化的任何纳米孔直径,在反储器中的局部电位变化对~ 100:1 $C_{顺}/C_{反}$ 室缓冲剂浓度比最大化。图4B为对于选择的100:1

$C_{\text{顺}}/C_{\text{反}}$ 溶液浓度比在1V TMV下10nm直径纳米孔在反储器中的相应计算电位变化分布的绘图。

[0104] 这证明,基于本文中发现在一个实施方案中,对于选择用于进行电位测定的所给储器部位,可利用在测定储器中较低缓冲剂浓度溶液选择两个储器中离子流体缓冲剂浓度比,以使在那个选择测定部位的电位变化幅度达到最大限度。引起的这种电位变化分布高度定位于几十纳米的纳米孔,如图4B中所示。对于100:1 $C_{\text{顺}}/C_{\text{反}}$ 溶液浓度比和恰在上面所给的纳米孔参数,可基于以上表达(9)确定,反储器的进入溶液电阻和纳米孔的溶液电阻确实在相同数量级内。

[0105] 利用这种储器流体溶液缓冲剂浓度安排和电位测定布置,应注意到,局部电位感测技术产生依赖跨膜电压(TMV)和离子电流信号的局部电位测定信号。其它基于纳米孔的感测器技术一般依赖移位物质和纳米孔感测器之间通过例如电耦合或量子机械穿隧直接作用。对于这些技术,纳米孔输出信号一般不直接关联TMV或离子电流,且在TMV变化时不应显著变化。相比之下,在本文的局部电位测定系统中,纳米孔感测器信号与TMV成比例,并且可认作为离子电流信号的线性放大。因此,局部电位测定信号和离子电流信号幅度二者均线性依赖TMV,但对于所给纳米孔几何形状和储器溶液浓度,它们之间的比是常数,如以上所给表达证明。

[0106] 局部电位测定方法的优点是低噪声测定的特征高带宽能力。低信号带宽是由于很小测定电流信号高带宽放大的困难限制通过常规离子电流堵塞测定技术直接纳米孔感测的问题之一。在用于DNA感测时,对于小纳米孔,可能尤其如此。在局部电位感测方法中测定大的局部电位信号,而不是小电流信号,因此,信号带宽不受电流放大器能力限制。因此,高带宽信号处理电子器件可集成到固态纳米孔感测结构上。

[0107] 另外,除了固有散粒噪声和约翰逊噪声外,通过跨纳米孔薄膜电容耦合引入贡献到离子电流堵塞测定技术的大部分噪声,噪声的该电容耦合部分在纳米孔操作的某些阶段占压倒优势。为了使噪声最大限度地减小,常规需要很小薄膜面积暴露于储器溶液。在本文局部电位测定方法中,因为对于合理储器浓度比围绕纳米孔局部电位信号在数十纳米内衰减,局部电位测定信号只受该局部体积内储器溶液之间的电容耦合影响。因此,在局部电位测定感测方法中自动排斥大部分电容耦合噪声。

[0108] 参考图4C-4D,在一个实施方案中,可选择储器缓冲剂溶液浓度比,以优化纳米孔感测器的信号带宽。假定要在纳米孔的一侧进行局部电位测定,假设在纳米孔的反侧,则合理地高设定顺储器溶液浓度,例如,约4M,接近饱和溶液,以使纳米孔溶液电阻最大限度地减小。然后,例如,基于图4C的绘图,作为带宽函数分析信号噪声。在此绘制对噪声的多种贡献和对流体纳米孔操作预期的信号。标为“自由空间”的绘图指基于自由空间分子大小计算。标为“Bayley”的绘图指来自Bayley等人,在J. Clarke等人,“Continuous Base Identification for Single-Molecule Nanopore DNA Sequencing”(用于单分子纳米孔DNA测序的连续碱基识别), Nature Nanotechnology, N. 4, pp.265-270, 2009的先前论文的基于分子大小计算。两条信号线是在四个DNA碱基之间达到的最小信号差,这个最小信号存在于A和T碱基之间。在此,纳米孔作为石墨烯薄膜中的1nm直径纳米孔给出,具有4M顺储器溶液浓度、50:1储器之间缓冲剂浓度比和约 $10^{-9}\text{V}/\sqrt{\text{Hz}}$ 电压噪声密度。石墨烯的介电损耗因数未知,因此,为方便起见使用1。经发现,绘图中信号和总噪声的交点设定1:1信号-噪

声比(S/N)。这是最高可能的信号带宽。例如,对于流体纳米孔操作,1:1 S/N比在约100MHz带宽。大于约50MHz的带宽和100MHz带宽都可能是优选的。

[0109] 参考图4D的绘图,100MHz带宽相当于约50:1储器溶液浓度比,其中局部电位测定在纳米孔的低浓度储器侧作出。对于在此实例中使用的纳米孔感测器参数,高于约50:1的任何储器浓度比将减小带宽。低于约50:1的任何浓度比将减小信号-噪声比。因此,在此发现,带宽可优化,并存在储器浓度比最优化点,即,50:1。在一个实施方案中,可基于纳米孔感测器的特征噪声和纳米孔感测器的所需操作带宽之间的折衷选择储器溶液浓度比。因此,应认识到,为了使噪声最大限度地减小,可增加储器溶液浓度比,但带宽可相应减小。或者,可利用电子信号处理(例如低通滤波)或其它信号处理。

[0110] 还应认识到,对于所给物质对象移位通过纳米孔,一般较小直径纳米孔产生较大信号。然而,对于例如感测特定分子(如DNA)的应用,纳米孔广度优选基于分子广度,并相应调节储器浓度比。

[0111] 在另一个实施方案中,也可选择储器缓冲剂溶液浓度比,以产生从纳米孔部位测定适应所选择局部电位测定装置的信号衰减长度。应认识到,信号的衰减长度应足够大,以使电位测定装置布置适应在衰减长度内。图4E为用于一定范围缓冲剂浓度比的信号衰减长度的绘图,假定要在纳米孔的反储器侧进行局部电位测定。绘图基于绘图中插图所示的电路模型。

[0112] 基于这一分析显示,在大于约20或30的浓度比,产生足够信号衰减长度适应能够在衰减长度内测定局部电位的装置。在大于约50:1的浓度比提供充分衰减长度,用于在衰减长度内进行局部电位测定。大于约5nm的信号衰减长度和例如约10nm和约20nm的信号衰减长度可能是优选的。

[0113] 用纳米孔感测器分析确定相对顺和反溶液离子浓度的这个具体实施方案是基于物质移位通过纳米孔引起的纳米孔电阻和储器接入电阻变化的考虑。本文方法提供另外考虑物质移位期间远离纳米孔紧邻的顺储器和反储器流体电阻变化的进一步分析、方法和结构。

[0114] 参考图5,在此进一步实施方案中示意显示本文提供的纳米孔感测器100,纳米孔感测器100在支持结构14中布置的纳米孔12相反侧上包括顺储器102和反储器104。纳米孔必须在两个储器之间的流体连通通道穿过。流体通道105布置在一个储器(在此显示为反储器)和纳米孔12之间,以通过流体通道使那个储器以流体连接到纳米孔。流体通道具有大于通道横截面广度、宽度或直径的通道长度,并连接以能够在纳米孔和通道通向的储器之间流体连通。布置第二储器,在此为顺储器,用于通过纳米孔与流体通道连通。第二储器不需要包括第二流体通道。

[0115] 与上述纳米孔感测器实例一样,本实施方案的纳米孔感测器100可包括电极13、15和电压源16,用于在储器之间跨固态支持结构施加电位。纳米孔布置在适合支持结构中,为固态、生物或以上述方式这两种的一些组合。

[0116] 该纳米孔感测器实施方案可电模型化,如图6的电路中所示。在这个模型中,纳米孔的长径比(即,纳米孔直径和长度之比)和流体通道的长径比假定足够大,以便能够忽略反储器室和顺储器室的流体接入电阻。然后定义流体通道电阻 R_{FP} 和纳米孔电阻 $R_{孔}$ 。还假定,流体通道的流体电阻 R_{FP} 比顺储器的总体流体电阻大得多,也比反储器的总体流体电阻大得

多。因此,如图6中所示,纳米孔感测器电阻可模型化为流体通道电阻和纳米孔电阻。

[0117] 参考图6和图5两图,在感测器中提供如上所述的电转换元件7,以感测流体通道105局部的电位,并显示指示流体通道中局部电位的特征。电连接,例如装置或装置的区域和/或电路、线或感测装置和/或电路部位局部电位的电路元件的组合,可提供为转换元件,以显示指示局部电位的信号。电转换元件7的位置可在存储器中,在支持结构的表面上,如图5中所示,在流体通道内的位置或纳米孔感测器内的其它位置。

[0118] 如图6中所示,在一个实施方案中,可提供电路20,用于支持电转换元件,即,例如晶体管装置,晶体管装置具有源极S、漏极D和通道区域。通道区域可物理布置在纳米孔感测器环境中的位置,以进行局部电位测定。晶体管通道区域的这个物理位置可在访问局部电位的任何方便和适合部位。

[0119] 现在考虑这种纳米孔感测器布置,如果流体通道105的电阻可与纳米孔12的电阻相比,则关于一个储器相对于纳米孔的接入电阻,如表达(11),流体通道的局部电位测定使指示物质以上面讨论方式移位通过纳米孔的信号测定最大化。利用在图5-6的电路图中所示部位测定局部电位,感测电压 $V_{\text{感测}}$ 给出为:

$$[0120] \quad V_{\text{感测}} = V_0 R_{FP} / (R_{\text{孔}} + R_{FP}) \quad (12)$$

[0121] 其中 $R_{\text{孔}}$ 为纳米孔的电阻, R_{FP} 为流体通道的电阻, V_0 为从电路跨纳米孔施加的电压16。

[0122] 要在物质移位通过纳米孔期间检测的电压信号 $V_{\text{信号}}$ 为由于移位物质部分堵塞纳米孔的纳米孔相应小电阻变化引起的小电压变化, $V_{\text{信号}}$ 给出为:

$$[0123] \quad V_{\text{信号}} = \frac{\partial V_{\text{感测}}}{\partial R_{\text{孔}}} dR_{\text{孔}} \quad (13)$$

[0124] 在 $\frac{\partial V_{\text{信号}}}{\partial R_{FP}} = 0$ 时,该信号最大化,这需要 $R_{FP} = R_{\text{孔}}$ 。

[0125] 这一关系证明,如果流体通道电阻不与纳米孔电阻相同,则可检测的电压信号小于可能最大化电压信号。达到的实际电压信号和最大化测定电压信号之间之比 $R_{\text{信号}}$ 告诉该系统离最佳条件有多远,比指标给出为:

$$[0126] \quad R_{\text{信号}} = \frac{4(R_{FP} / R_{\text{孔}})}{(1 + \frac{R_{FP}}{R_{\text{孔}}})^2} \quad (14)$$

[0127] 表达(14)标绘于图7中。这一绘图表明,在流体通道电阻为纳米孔电阻的10%时,电压信号 $V_{\text{信号}}$ 大于最大可达到信号的30%。因此,按照此分析的意图,将其中在流体通道电阻 R_{FP} 为纳米孔电阻 $R_{\text{孔}}$ 的至少约10%而不大于纳米孔电阻约10倍时的条件认为是流体通道电阻和纳米孔电阻匹配。

[0128] 为了确定满足这些电阻匹配需要的流体通道的结构和几何要求,在一个实例方法中,可假定纳米孔和流体通道二者一般均具有圆筒形几何形状。另外,如上所述,对于此分析,可忽略顺和反储器的接入电阻,假定纳米孔和流体通道的长径比相对于顺和反储器相对较高。最后,假定顺和反储器之间的离子浓度扩散在稳态条件,如果两个储器中的离子浓

度不同。

[0129] 图8为限定流体通道105的几何形状的示意图。在此, l_1 、 r_1 和 l_2 、 r_2 分别为纳米孔和流体通道的长度和半径。 C_C 、 C_I 和 C_T 分别为顺室中的离子溶液浓度、在纳米孔和流体通道之间界面的离子溶液浓度和反室中的离子浓度。

[0130] 在稳态条件下, 纳米孔和流体通道中的离子浓度的扩散流量Flux在所述条件下相等, 为:

$$[0131] \quad \text{流量} \propto \frac{C_C - C_I}{l_1} r_1^2 = \frac{C_C - C_T}{l_2} r_2^2 = \text{常数} \quad (15)$$

[0132] 由此, 界面浓度 C_I 可定义为:

$$[0133] \quad C_I = \frac{C_C l_2 r_1^2 + C_T l_1 r_2^2}{l_2 r_1^2 + l_1 r_2^2} \quad (16)$$

[0134] 因此, 纳米孔中的离子浓度 $C_{\text{孔}}$ 和流体通道中的离子浓度 C_{FP} 给出为:

$$[0135] \quad \begin{cases} C_{\text{孔}} = \frac{C_C - C_I}{l_1} x_1 + C_I \\ C_D = C_I - \frac{C_I - C_T}{l_2} x_2 \end{cases} \quad (17)$$

[0136] 在正常测定条件下, 溶液的电导率 σ 一般近似与溶液的离子浓度成比例, 为:

$$[0137] \quad \sigma = \Sigma \cdot C,$$

[0138] 其中 Σ 为溶液的摩尔电导率, C 为离子浓度。利用这一关系, 纳米孔的电阻 $R_{\text{孔}}$ 和流体通道的电阻 R_{FP} 给出为:

$$[0139] \quad \begin{cases} R_{\text{孔}} = \int_0^{l_1} \frac{dx_1}{\Sigma C_{\text{孔}} \pi r_1^2} = \frac{l_1}{\pi \Sigma r_1^2 (C_C - C_I)} \ln\left(\frac{C_C}{C_I}\right) \\ R_{\text{FP}} = \int_0^{l_2} \frac{dx_2}{\Sigma C_{\text{FP}} \pi r_2^2} = \frac{l_2}{\pi \Sigma r_2^2 (C_I - C_T)} \ln\left(\frac{C_I}{C_T}\right) \end{cases} \quad (18)$$

[0140] 然后可从表达(18)确定电阻比, 为:

$$[0141] \quad \frac{R_{\text{FP}}}{R_{\text{孔}}} = \frac{\ln\left(\frac{C_C l_2 r_1^2 + C_T l_1 r_2^2}{C_T l_2 r_1^2 + C_I l_1 r_2^2}\right)}{\ln\left(\frac{C_C l_2 r_1^2 + C_C l_1 r_2^2}{C_C l_2 r_1^2 + C_T l_1 r_2^2}\right)} \quad (19)$$

[0142] 为了得到最大电压信号, 该电阻比最佳为一, 或者 $\frac{R_{\text{FP}}}{R_{\text{孔}}} = 1$ 。

[0143] 通过在表达(19)中设定该比为数值1, 则:

$$[0144] \quad \ln\left(\frac{C_C l_2 r_1^2 + C_C l_1 r_2^2}{C_C l_2 r_1^2 + C_T l_1 r_2^2}\right) - \ln\left(\frac{C_C l_2 r_1^2 + C_T l_1 r_2^2}{C_T l_2 r_1^2 + C_I l_1 r_2^2}\right) \quad (20)$$

[0145] 为了简化这一表达, 顺和反室中的离子浓度比 C_C/C_T 可定义为 R_C , 流体通道半径与纳米孔半径之比 r_2/r_1 可定义为 R_r 。纳米孔的长径比 $AR_{\text{孔}}$ 可定义为 $AR_{\text{孔}} = l_1/r_1$, 流体通道的长径比 AR_{FP} 可定义 $AR_{\text{FP}} = l_2/r_2$ 。简化表达则给出为:

$$[0146] \quad AR_{FP} = \frac{1}{\sqrt{R_C}} \cdot R_r \cdot AR_{\lambda} \quad (21)$$

[0147] 该表达直接显示,为了使流体通道电阻与纳米孔电阻匹配,流体通道的长径比必须与流体通道半径和纳米孔半径之比成比例增加。如果顺和反室中流体溶液离子浓度相等,则流体通道的长径比只由流体通道和纳米孔的半径比设定。如果流体溶液离子浓度不相等,则流体通道满足此条件所需的长径比减小相应因数,假定在例如流体通道和反室中提供低浓度溶液,而在顺室中提供高浓度溶液。在一个实施方案中,可以上述方式与流体通道设计一致利用大离子浓度比,以减小对流体通道的长径比要求,同时保持流体通道和纳米孔之间电阻匹配。

[0148] 在制造或其它考虑不允许产生具有与纳米孔实质电阻匹配的尺寸的流体通道时,可考虑以上完全比表达(14),假定比率中的所有变量关系为:

$$[0149] \quad \frac{R_{FP}}{R_{\lambda}} = \frac{\ln\left(\frac{R_C AR_{FP} + AR_{\lambda}}{AR_{FP} + AR_{\lambda}} \frac{R_r}{R_r}\right)}{\ln\left(\frac{R_C AR_{FP} + R_C AR_{\lambda}}{R_C AR_{FP} + AR_{\lambda}} \frac{R_r}{R_r}\right)} \quad (22)$$

[0150] 关于这一关系的实例,如果流体通道的直径为纳米孔直径的1000倍,例如1.5 μ m对比1.5nm,则对于3:1的纳米孔长度与纳米孔直径长径比,对流体通道长度与流体通道直径将流体通道的长径比设定为300:1,在此为450 μ m深,以在顺室和反室之间利用100:1离子浓度差时匹配纳米孔电阻。这一结果显示于图9的绘图中,图9显示关于3:1长径比纳米孔、100:1离子浓度差和1000倍纳米孔直径的流体通道直径假定的电阻比。

[0151] 不需要这种完美电阻匹配。如上解释,在流体通道电阻为纳米孔电阻的10%时,电压信号 $V_{\text{信号}}$ 大于最大可达到信号的30%。例如,假定流体通道具有50:1长径比,具有75 μ m长度,这可提供纳米孔电阻>20%,如图9中绘图所示,并且可得到最大电压信号的~60%,如图10绘图中所示。基于电阻-电压信号关系,如图9绘图中所示,可确定对于纳米孔感测器满足性能规范所需的流体通道长径比。因此,不需要特殊流体通道长径比,只要通道长度大于通道直径。所有所需的是在能够测定流体通道局部电位的纳米孔感测器中一些部位布置电转换元件。

[0152] 包括在纳米孔和储器之一之间连接的流体通道的此纳米孔布置可抵消只由顺和反室离子溶液浓度差别所造成的一些限制。在包括不同离子浓度但无流体通道的纳米孔感测器中,离子浓度影响纳米孔电阻和顺反储器接入电阻,且在此情况下,纳米孔电阻与一个储器接入电阻匹配的能力受到限制,因此限制可产生的电压信号。另外,流体接入电阻位于纳米孔附近,且为距纳米孔的距离的函数,因此,对于可移动电转换元件,例如两亲薄膜层,可有显著信号波动。在纳米孔和一个储器之间包括流体通道使得能够结构限定流体电阻,并对纳米孔感测器增加另外的控制参数。通过控制流体通道长径比和顺反储器离子溶液浓度,可调谐纳米孔感测器,以优化电压信号测定。

[0153] 可在能够选择长径比和与纳米孔感测器集成的任何便利布置中构造连接储器到纳米孔的流体通道。参考图11,流体通道105也可形成井、沟、通道或在提供用于限定纳米孔的结构中的其它流体容纳室。例如,流体通道可以为管、通道、开口沟、通路或与其中安排纳米孔12的支持结构14布置的结构120中的其它几何形状。在此实例中,支持结构层14布置在

用于提供纳米孔12的基片120上。流体通道在基片120中形成。流体通道的壁115可构造成提供适合流体通道横截面几何形状,例如大致环形、椭圆形、圆形、方形或其它几何形状。流体通道连接到具有任何维数的储器,例如反储器;附图示意表示反储器,显示反储器具有任何维数,且一般不是像流体通道那样的高长径比通道。

[0154] 参考图12,流体通道105可与纳米孔支持结构相反布置。例如,可在纳米孔支持结构14上提供材料层125,且流体通道105限定在材料层125中。支持纳米孔支持结构14的基片或结构120可与流体通道相反提供,在支持结构14的反侧上。图11-12的流体通道结构表明,流体通道可布置在纳米孔感测器的任何便利位置上。

[0155] 参考图13,流体通道105可作为一组孔、井、通道或其它几何形状以选择的布置提供。例如,流体通道105可包括阳极化氧化铝(AAO)层。AAO为可用很高长径比孔形成的常规材料,例如 $>1000:1$,具有约100nm直径。这些AAO孔在准六边形晶格以二维布置,且晶格常数在数百纳米范围内。氧化铝薄膜可在可控制阳极化条件下阳极化,这样的阳极化可在具有表面预图形化的薄膜上进行,以调节AAO晶格常数和孔直径。AAO孔组共同作用以提供有效长径比。这种AAO布置为具有可用作流体通道的孔、井、通路或其它通道组的有孔膜、薄膜或其它结构的实例。

[0156] 另外,任何流体通道结构可用凝胶或其它多孔物质或布置在流体通道内以增加流体通道流体电阻率的选择材料填充。

[0157] 流体通道可以垂直布置、水平布置或水平和垂直几何形状组合构造。参考图4,在一个实施方案中,图4示意显示包括垂直通道区段134和水平通道区段136的流体通道。这种布置可在例如支持结构14上的表面层132中提供,或者可集成进入基片或其它结构元件。

[0158] 参考图15A和15B,流体通道105可以达到选择流体通道长径比的任何适合通路的横向或垂直几何形状构造。如图15A中示意图所示,横向或垂直自身旋绕的通道可构造用于达到选择的流体通道长径比。如图15B中示意图所示,可供选用横向或垂直的蜿蜒通道作为流体通道。不需要特殊几何形状,流体通道可穿过在储器和纳米孔之间连接的多种材料和不同支持结构元件。几何形状可在感测器中支持结构、基片或元件组合上的层中提供。流体通道的口140可以水平或垂直方向连接,以在液体储器和纳米孔之间提供流体连通。

[0159] 在不同实施方案中,这些不同流体通道结构可包括例如AAO薄膜,该薄膜具有约150nm直径的孔,孔与孔距离约300nm,薄膜厚度在约100 μm -1000 μm 之间;平面PDMS/氧化物/氮化物通道,该通道具有约0.5 μm -1 μm 之间宽度,约100nm-200nm之间深度,和约200 μm -500 μm 之间长度;介电材料中的深井,具有约0.5 μm -2 μm 之间的井直径,和约20 μm -50 μm 之间直径;和硅晶片井,具有约2 μm -6 μm 之间直径,和约200 μm -300 μm 之间深度。在各个这些实施例中,顺反离子浓度可相同,或者可不同,且选择的离子浓度比例如在约50:1-1000:1之间,作为顺离子浓度:反离子浓度比。

[0160] 转向用于在流体通道中进行局部电位测定的具有电转换元件的流体通道的实施方式,如上解释,可在纳米孔感测器中用适应纳米孔实施方式的任何适合装置或电路进行局部电位测定。参考图16A-16E,刚在上面描述的流体通道结构可适应在到流体通道的纳米孔连接部位包括电转换元件。图16A的结构相当于图11的流体通道设计。在此,可利用绝缘体上硅(SOI)晶片形成具有氧化物埋层(BOX)和在其顶上提供的硅层152的基片120。可在这些层150、152中形成纳米孔12。硅层152可构造成为在纳米孔部位进行局部电位测定的电导

通道,并提供电导源极154和漏极156区域,用于测定由硅电导通道转换的电导。类似地,如图16B中所示,硅层152可构造成为具有源极和漏极区域154、156的电导通道区域,此处限定流体通道的层125中。如图16C中所示,金属、碳纳米管或其它材料的感测电极158可在纳米孔12的部位构造,并例如由漏电极156连接用于感测。

[0161] 参考图16D-16E,附图以横截面显示具有转换元件的横向流体通道通路。在图16D的结构中,流体通道105在层158中提供,例如,氮化物层。氮化物层158在具有下面BOX层150的支持结构14上提供,例如,来自SOI晶片的硅层152。源极区域和漏极区域154、156连接到硅层152,硅层152图形化为通道,用于转换在纳米孔的局部电位。在图16E中所示的结构中,在顶层160(如PDMS)中提供流体通道,以横截面显示以描绘通道,如图15A-15B中的通道。通道可模塑进入顶层160,然后连接到纳米孔感测器结构。来自SOI晶片的硅层152可构造成为电导通道,该电导通道具有源极和漏极区域154、156,连接用于转换在纳米孔的局部电位。图16A-16E中的这些结构分别能够感测在纳米孔的流体通道中的局部电位。

[0162] 对于任何纳米孔感测器实施方案,可在具有或不具有流体通道下利用一定范围的另外的电转换元件。对于很多应用,基于纳米线的FET装置可以为非常适合装置,但在本文中不需要这些。可利用SET、QPC、脂质双层或其它装置和纳米孔工具,无论是生物还是固态。可利用能够测定局部电位的任何电路或装置。

[0163] 在一个实例中,可在纳米孔部位构造纳米线FET,如图17中所示,为了清楚,没有流体通道。在此纳米线实施方式60中,在其中布置纳米孔12的支持结构14上提供纳米线62。纳米线可由任何适合电导或半导体材料形成,包括富勒烯结构和半导体。本文所用术语“纳米线”指与从上述纳米孔部位测定的信号衰减长度相容的宽度特征的电导通道。通道宽度优选在与衰减长度相同的数量级,并且可以更大。纳米线可由在选择储器溶液中稳定的任何半导体材料制成。

[0164] 图18为图6的纳米孔感测器的实施方式65的透视图。在此显示在薄膜支持结构14上提供的纳米线62,支持结构14跨其广度自支持,就像弹床一样,在边缘在支持框架之间,提供在支持结构64例如基片上。纳米线提供在薄膜上,薄膜具有通过纳米线和薄膜厚度延伸的纳米孔。如图17和18中所示,纳米孔不延伸跨过纳米线的宽度。有沿着纳米孔广度无破损的纳米线区域,以便电导沿着纳米线长度连续。在纳米线各端提供金属化区域或其它电导区域,以形成源极(S)和漏极(D)区域。利用这种结构,利用顺反储器和连接到储器之一的流体通道,用于检测物质从一个储器通过纳米孔移位到另一个储器,可构造纳米孔感测器。

[0165] 也参考图19A-19B,支持结构和纳米线结构可以多种供选布置实施,且对于其中纳米线材料自支持并且可自身作为其中布置纳米孔的支持结构的应用,不需要支持结构,例如薄膜支持层。例如,如图19A-B中所示,在基于石墨烯的纳米孔感测器68中,可提供支持层70,支持层70继而支持石墨烯薄膜72。石墨烯薄膜72跨支持层70中的孔自支持。石墨烯薄膜继而支持纳米线62,且纳米孔12延伸通过纳米线和石墨烯厚度,纳米线沿着纳米线的一些点连续保留。如图20A-20B中所示,此布置可以改变,在支持层70上在石墨烯层72下布置纳米线62。

[0166] 在供选的石墨烯基纳米孔感测器75中,如图21A-21B中所示,可构造支持结构,例如支持层70,在其上布置石墨烯层68,该石墨烯层68用于提供其中构造纳米孔12且自身用于提供纳米线的结构。石墨烯可以在纳米孔12部位提供需要纳米线的任何适合几何形状提

供。在此布置中,由于其厚度和电导率,石墨烯层68感测在纳米孔两侧的局部电位,即,石墨烯层的电导作为反顺两个储器中局部电位的函数变化。因此,对于该石墨烯基纳米孔感测器,局部电位测定的纳米孔感测器信号为顺反储器电位差的指示。

[0167] 因此,可用很宽范围电转换元件中的任一种来测定纳米孔感测器流体通道局部的电位。可利用半导体基FET或其它感测装置、连接到装置(例如FET装置)的感测金属电极、石墨烯基装置或其它适合转换元件。

[0168] 如这些布置证明,可用任何宽范围材料组合和厚度中的任一种构造支持层、支持层薄膜、纳米线和支持结构。上述流体通道结构可集成到任何这些布置。对于很多应用,其中布置纳米孔的结构可优选尽可能薄,且优选不厚于要检测的物质对象或对象区域的广度。如上解释,支持结构材料可包括氮化物、氧化物、导体、半导体、石墨烯、塑料或其它适合材料,可电绝缘或电导。

[0169] 如图22A-22D中所示,对于纳米线实施方式,纳米孔在纳米线62的位置提供,以便通过纳米线提供用于电导的无破损连续通道。纳米孔可在纳米线的中央区域提供,如图22A中所绘,可在纳米线的边缘提供,如图22B-22C中所绘,或者可在接近或邻近纳米线的部位提供,如图22D中所绘。在所有情况下,通过纳米线提供用于电导的连续通道。

[0170] 在图22A-22C的纳米孔布置中发现,与纳米孔钻孔前相同区域的灵敏度比较,纳米孔区域的灵敏度也显著提高。通过解释纳米线作为电导通道的横截面面积减小的模型,可了解这种灵敏度定位,假定所有其它材料性质保持不变,例如掺杂水平和移动性。减小纳米线横截面面积增加纳米孔区域的电阻,因此,缓解来自纳米线其它部分的串联电阻和信号衰减。对于长方形纳米孔作为实例,可从以下方程定量得到在纳米孔区域的这种灵敏度提高:

$$[0171] \quad \Delta = \left(\frac{\rho_0 L}{\rho(L - L_0) + \rho_0 L_0} \right)^2 \quad (23)$$

[0172] 在此, Δ 为灵敏度提高,限定为具有纳米孔的装置的灵敏度除以没有纳米孔的灵敏度, ρ_0 和 ρ 分别为具有和不具有纳米孔的纳米线电导通道的线性电阻率。L为总通道长度, L_0 为纳米孔区域的通道长度,对于这个方形实例,等于沿着纳米线轴方向纳米孔的边长。对于纳米线的其它部分,由于所有参数保持相同,但总通道电阻由于纳米孔略微增加,在纳米孔钻孔后灵敏度应略微减小。在纳米孔区域增加灵敏度和所有其它纳米线部分减小灵敏度组合使纳米孔感测器灵敏度提高,在纳米孔自对准和定位。

[0173] 在制造纳米孔感测器中,对于包括流体通道的实施方案和不包括流体通道的实施方案,首先考虑基于纳米线的固态纳米孔感测器,短通道纳米线可能是优选的,且对于很多应用,硅纳米线(SiNW)可能是优选的,因为已证明SiNW为用于在溶液中有显著稳定性的亚细胞和单病毒级信号传导的极佳电位和电荷感测器。为了使来自通道串联电阻的信号衰减最大限度地减小,如果需要,可通过镍固态扩散使SiNW通道减小到小于约200nm。SiNW可通过例如化学气相沉积或其它适合方法产生,并通过溶液布置在选择薄膜上,例如氮化物薄膜。对于很多应用,可适合利用市售氮化物薄膜芯片。可用电子束蚀刻或光蚀刻在纳米线端产生源极和漏极。所有电极和电触点要用例如氮化物或氧化物材料钝化,这可在金属蒸发之后和剥离过程之前进行。纳米孔可在选择部位产生,例如,通过电子束,或通过产生选择

纳米孔尺寸的另一束物质或蚀刻过程。

[0174] 在制造在石墨烯薄膜顶上包括纳米线结构的石墨烯基纳米孔感测器中,如图19A-19B的石墨烯基纳米孔感测器,首先处理薄膜,例如氮化物薄膜,以在薄膜中形成微米大小的孔,例如,通过电子束蚀刻或光蚀刻和反应离子蚀刻(RIE)。然后,在氮化物薄膜上布置石墨烯片或件,盖在孔上,以形成石墨烯薄膜。石墨烯片可通过CVD或其它方法合成,或者通过机械剥落产生,并转移到氮化物薄膜,在氮化物薄膜孔上。

[0175] 然后,可利用金属蒸发进行电子束蚀刻或光蚀刻,以常规方式在氮化物薄膜上限定电极。可用电泳或其它适合方法使纳米线在石墨烯薄膜顶上在氮化物薄膜中孔的位置对齐,例如硅纳米线。然后,可利用金属蒸发进行电子束蚀刻或光蚀刻,以在SiNW端限定源极和漏极触点。随后,通过电子束蚀刻或光蚀刻和例如UV-臭氧剥离机、氧等离子或其它适合方法从预期石墨烯薄膜位置以外的区域去除石墨烯,可去除过量石墨。最后,通过在纳米线和下面石墨烯薄膜的部位产生纳米孔,例如,通过电子束铣削、离子束铣削、蚀刻或上述其它适合方法。

[0176] 在制造包括在纳米线FET结构顶上的石墨烯薄膜的石墨烯基纳米孔感测器中,如图20A-20B的石墨烯基纳米孔感测器,可利用适合结构构造该布置,例如,利用绝缘体上硅芯片(SOI)。在此实例中,首先通过SOI芯片的背面厚硅部分形成孔,例如,通过 XF_2 蚀刻,在氧化层上中止,以形成氧化硅薄膜。然后,用电子束蚀刻或光蚀刻从SOI芯片在较小孔区域去除氧化物层,从SOI芯片的薄硅区域产生硅薄膜。然后,蚀刻该硅薄膜,以形成硅纳米线,例如,利用电子束蚀刻或光蚀刻和化学蚀刻或RIE。在一个实例中,形成燕尾形Si片,如图20B中所示,与SOI芯片的氧化物薄膜中的孔对准。

[0177] 然后,可利用金属蒸发进行电子束蚀刻或光蚀刻,以常规方式在氧化物层上限定电极。然后,在氧化物薄膜上布置石墨烯片或件,盖在孔上,以在硅纳米线上形成石墨烯薄膜。石墨烯片可通过CVD或其它方法合成,或者通过机械剥落产生,并转移到氧化物薄膜,盖在SiNW和氧化物薄膜孔上。应认识到,由于石墨烯片盖在图形化硅层顶上,石墨烯片可不是平的。如果泄漏是这一布置的问题,则可围绕石墨烯边缘涂覆例如 SiO_x 薄层,以形成密封边缘条件。

[0178] 随后,通过电子束蚀刻或光蚀刻和例如UV-臭氧剥离机、氧等离子或其它适合方法从预期石墨烯薄膜位置以外的区域去除石墨烯,可去除过量石墨。最后,与最窄Si几何结构位置相关,通过在上方的石墨烯和硅纳米线的部位产生纳米孔,例如,通过电子束。

[0179] 在制造如图21A所绘的石墨烯基纳米孔感测器中,首先处理薄膜,例如氮化物薄膜,以在薄膜中形成微米大小的孔,例如,通过电子束蚀刻或光蚀刻和反应离子蚀刻(RIE)。然后,在氮化物薄膜上布置石墨烯片或件,盖在孔上,以形成石墨烯薄膜。石墨烯片可通过CVD或其它方法合成,或者通过机械剥落产生,并转移到氮化物薄膜,盖在氮化物薄膜孔上。

[0180] 然后,可利用金属蒸发进行电子束蚀刻或光蚀刻,以常规方式在石墨烯薄膜上限定源极和漏极。随后,通过电子束蚀刻或光蚀刻和例如UV-臭氧剥离机、氧等离子或其它适合方法以燕尾或其它选择形状使石墨烯图形化,以邻近为纳米孔选择的部位产生窄石墨烯区域。最后,通过石墨烯薄膜产生纳米孔,例如,通过电子束。

[0181] 在制造如图1F的SET基纳米孔感测器中,可利用任何适合电导和电绝缘薄膜材料。可利用氮化物薄膜结构或其它结构,例如石墨烯薄膜或如上所述组合石墨烯-氮化物薄膜

结构。如果利用电导薄膜材料,则可优选用绝缘层(例如,氧化物或氮化物层)在其上要形成SET的薄膜侧上涂覆该材料。然后,可用电子束蚀刻和金属蒸发技术形成在适合金属外的源极和漏极区域和SET区域。然后,可按以上所给方式在SET位置形成纳米孔。如果在电导薄膜材料上提供绝缘层且绝缘层涂覆纳米孔通过薄膜的长度,则可优选从纳米孔侧壁去除绝缘材料,例如,通过从纳米孔背面HF或其它适合蚀刻,以从纳米孔和从纳米孔附近去除绝缘层。

[0182] 在制造具有纳米孔如图1G的QPC布置中,可利用SOI结构,以上述方式去除厚硅层,然后用电子束蚀刻限定QPC布置中的顶硅层结构。然后按以上所给方式通过薄膜形成纳米孔。

[0183] 在所有这些方法中,可包括一个或多个过程步骤和另外的材料,以形成在纳米孔和流体储器之一之间连接的流体连通。利用氧化物、玻璃、PDMS或其它材料结合到氮化物或氧化物层,以密封流体通道,可通过在纳米孔部位图形化蚀刻氮化物或氧化物层限定平通道。或者,厚材料层可经蚀刻或钻孔,例如氧化物层、氮化物层、PDMS层、聚合物或其它层,例如,通过深反应离子蚀刻(RIE),以限定流体通道。另外,如上所述,可蚀刻下面支持基片,例如硅晶片,例如,通过RIE,以通过晶片厚度形成流体通道。这些示例方法不是限制,而是作为制造纳米孔感测器的一般技术实例提供。可利用任何适合支持结构材料和装置材料。

[0184] 纳米孔感测器制造方法可定制成适应任何纳米孔支持结构,无论固态、生物还是这两种的一些组合。如上解释,可利用在固态支持结构孔中布置的蛋白纳米孔,例如如上所述的FET通道材料。进一步如上所述,可利用如在两亲层中布置的蛋白纳米孔,或在FET通道部位固态支持结构中的孔。在包含纳米孔的支持结构中可利用任何材料组合。

[0185] 在各个这些方法中,纳米孔的尺寸优选基于储器缓冲剂溶液浓度的所选比率选择,以与考虑用纳米孔感测器研究的物质对象结合以上述方式取得所需电位测定。对于要由移位通过纳米孔检测的所给物质,可与能够关于物质纳米孔感测电位测定的其它纳米孔感测器参数和操作一致,用以上分析表达确定最佳纳米孔大小。

[0186] 这对进行物质纳米孔移位时不同物质对象之间区分能力最大化特别重要。上述石墨烯基纳米孔感测器对感测分子物质特别有吸引力,例如DNA和其它生物聚物质,因为石墨烯厚度大约为DNA碱基广度。但由于石墨烯通过顺反储器溶液在石墨烯的两侧电门控,且两个储器中的电位相反,由石墨烯电位测定指示的电位的总和小于在薄膜一侧上由纳米线实施方式指示的。但对于小纳米孔(例如约1nm直径)和具有在顺反储器之间足够大缓冲剂浓度比,由石墨烯电位测定指示的电位的总和可与纳米线纳米孔感测器相比。

[0187] 通常,随着核苷酸或其它聚合物移位通过纳米孔,对于石墨烯基纳米孔感测器或其它纳米孔支持结构材料,可通过聚合物结合部分控制移位的速率。一般该部分可使聚合物顺着或逆着施加场移动通过纳米孔。该部分可以为分子马达,例如,在该部分为酶、酶活性或作为分子刹车的情况下。在聚合物为多核苷酸时,有一些控制移位速率的方法,包括使用多核苷酸结合酶。控制多核苷酸移位速率的适合酶包括但不限于聚合酶、解旋酶、外切核酸酶、单链和双链结合蛋白和拓扑异构酶(例如,促旋酶)。具体地讲,酶可以为解旋酶或改性解旋酶,如W02013-057495和W02014-013260所公开。对于其它聚合物类型,可使用与那种聚合物类型作用的部分。聚合物作用部分可以为任何W0-2010/086603、W0-2012/107778和Lieberman KR等人, J Am Chem Soc. 2010;132(50):17961-72)所公开的,对于电压门控

方案,Luan B等人, Phys Rev Lett. 2010;104(23):238103。

[0188] 应认识到,多于一个聚合物单元可在聚合物移位期间帮助测定信号,在此情况下,信号可称为k-链节依赖性,k-链节为聚合物的k个聚合物单元,其中k为正整数。信号依赖k-链节的程度取决于孔的形状和长度和聚合物类型。例如,随着多核苷酸移位通过MspA孔,可认为信号依赖5个核苷酸碱基。或者,例如,在纳米孔支持结构单原子薄时,信号可只依赖少数聚合物单元,并且可甚至由单聚合物单元支配。可用测定信号测定聚合物单元的序列概率,或确定分析物的存在或不存在。信号分析的适合示例性方法公开于W02013-041878和W02013-121224。

[0189] 实施例I

[0190] 在纳米孔感测器中制造SiNW FET

[0191] 用Au纳米颗粒催化化学气相沉积(CVD)方法合成SiNW。使30nm直径金纳米颗粒(Ted Pella Inc., Redding, CA)分散于用600nm厚氧化硅层涂覆的硅晶片(NOVA Electronic Materials Inc., Flower Mound, TX)上。在435°C和30torr,用2.4标准立方厘米/分钟(sccm)硅烷作为硅源,3sccm乙硼烷(100ppm,在氨中)作为硼掺杂剂源,10sccm氩作为载气,合成硼掺杂p型SiNW。标称掺杂比为4000:1(Si:B),生长时间为20分钟。通过中度超声处理~10秒使所得SiNW溶于乙醇。然后使NW溶液沉积于50nm厚、100 μm ×100 μm 氮化硅TEM薄膜栅格(SPIsupplies, West Chester, PA)。进行电子束蚀刻和蒸发60nm厚镍层,以在纳米线上产生~1 μm 隔开源极和漏极。然后,在金属蒸发后,立即通过等离子增强CVD(NEXX Systems, Billerica, MA)在芯片上沉积约75-100nm厚度氮化硅层,以钝化所有电极。

[0192] 然后剥离掩罩,以在具有钝化源极和漏极的氮化物薄膜上产生纳米线。然后,在形成气体中在380°C通过快速热处理器(HeatPulse 610, Total Fab Solutions, Tempe, AZ)使结构退火135秒,以使纳米线通道收缩到小于约200nm程度。在所得SiNW FET的电导率检验后,通过UV-臭氧剥离机(Samco International Inc., Amityville, NY)在150°C对各侧净化结构25分钟。然后,将结构装入场发射透射电子显微镜(TEM)(JEOL 2010, 200kV),并通过高能电子束会聚成一个点约2-5分钟,在选择位置通过纳米线钻出约9nm或10nm广度纳米孔。纳米孔位于纳米线边缘,如图22B中所绘,由此,纳米线宽度的实质部分是连续的。

[0193] 实施例II

[0194] 纳米孔感测器中SiNW FET的灵敏度分布

[0195] 纳米孔感测器的SiNW FET感测器的灵敏度由扫描门控显微(SGM)表征。SiNW FET装置根据实施例I的方法制造,在此,利用~2 μm 长通道长度,以适应SGM的有限空间分辨率。通过记录纳米线的电导作为-10V偏压电导AFM尖(PPP-NCHPt, Nanosensors Inc., Neuchatel, SW)位置的函数,在Nanoscope IIIaMulti-Mode AFM(Digital Instruments Inc., Tonawanda, NY)中进行SGM。在SGM记录期间,AFM尖高于表面20nm。

[0196] 在纳米线部位形成纳米孔之前,跨纳米线产生SGM分布。然后,在图22B所绘的布置中,在纳米线边缘形成纳米孔。利用存在的纳米孔,再次产生纳米线SGM分布。使用WSxM软件,通过以垂直方向在Si NW表观宽度(~100nm)平均电导确定SGM分布。图23为在形成纳米孔之前和形成纳米孔之后沿纳米线的灵敏度的绘图,灵敏度定义为电导变化除以AFM尖门压。显然,装置的灵敏度急剧定位,并与纳米孔对齐。更重要的是,与纳米孔形成前相同区域的灵敏度比较,纳米孔区域的灵敏度也显著提高。

[0197] 实施例III

[0198] 纳米孔感测器中纳米线-纳米孔的净化和组装

[0199] 在纳米孔形成后,通过UV-臭氧剥离机(Samco International Inc.)在150°C对各侧净化25分钟由以上实施例I的方法产生的纳米线-纳米孔组件。该净化过程优选去除结构上的任何可能碳沉积物。然后,使结构在形成气体中在250°C-350°C退火30秒,以恢复纳米线的电导。为了保证恰在组装之前纳米孔的亲水性,对结构各侧进行另外25分钟室温UV-臭氧净化。

[0200] 为了组装用于物质移位通过纳米孔的具有流体储器的纳米线-纳米孔结构,首先在DI水然后在70%乙醇最后在纯乙醇中超声处理PDMS室各~30分钟,然后在纯乙醇中储存。恰在组装前,将PDMS室在洁净玻璃培养皿中在~80°C烘烤~2小时,以去除大部分吸收的乙醇。

[0201] 制造用于电连接到纳米孔感测器的印刷电路板(PCB)芯片载体,并通过Scotch-Brite(3M, St. Paul, MN)净化,以去除铜表面氧化物和任何污染物,例如胶。然后在异丙醇随后在70%乙醇中超声处理PCB各~30分钟。恰在组装之前,在食人鱼溶液中净化金溶液电极~1小时。

[0202] 使用Kwik-Cast(World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL)硅氧烷胶水,将经净化的纳米线-纳米孔结构胶粘到PCB芯片载体的~250 μ m深中心凹点,装置侧面近似与PCB芯片载体其余部分齐平。通过接线(West-Bond Inc., Anaheim, CA),将装置的源和漏电极接线到芯片载体上的铜指。前PDMS室由PDMS片形成,该片在中心具有~1.8孔,为了压在纳米孔薄膜表面上以保证紧密密封,围绕孔开口一侧有~0.5mm突出体。PDMS室机械夹到芯片载体的两侧上,并将Au电极插入通过PDMS储器。金电极作为电连接,用于对PDMS室加偏压,以产生跨膜电压(TMV),用于电泳驱使物质移位通过纳米孔。

[0203] 选择反室作为其中用于纳米孔感测器进行电位测定的储器。因此,组件用薄膜定向布置,使得纳米线面向反储器定位。反室填充有具有~10mM缓冲剂浓度的溶液,利用10mM KCl + 0.1 \times TAE缓冲剂:4mM tris-醋酸盐和0.1mM EDTA溶液。因此,顺室填充有较高离子浓度溶液,以提供需要的储器浓度比,在反室中在局部电位测定部位提供较高评估电阻。顺室填充有1M缓冲剂溶液,缓冲剂为1M KCl + 1 \times TAE缓冲剂:40mM tris-醋酸盐和1mM EDTA。在使用前,两种溶液均经热压处理,通过室真空脱气,并由20nm Anotop注射滤器(Whatman Ltd., Kent, UK)过滤。

[0204] 实施例IV

[0205] DNA移位通过纳米孔的纳米孔感测

[0206] 操作通过以上实施例方法制造和用具有实施例III规定缓冲剂浓度溶液组装的纳米线-纳米孔结构,用于感测物质对象移位,即,1.4nM pUC19的双链DNA分子(dsDNA)。测定通过纳米孔的离子电流和来自纳米线FET装置的电流二者。

[0207] 利用 $\beta=0.1$ (1nA转成100mV)和2kHz带宽,通过Axon Axopatch 200B膜片钳放大器(Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA)放大离子电流。利用 10^6 放大(1nA转成1mV)和0.3ms升高时间,通过DL 1211电流放大器(DL Instruments)放大纳米线FET电流。跨膜电压(TMV)和纳米线FET源极和漏极之间的电压 V_{sd} 二者均通过Axon Digidata 1440A数字转换器(Molecular Devices, Inc.)获取。将纳米孔离子电流和纳米线FET信号二者送入1440A数

字转换器,并通过计算机在5kHz记录。操作纳米孔感测器在黑暗法拉第笼中进行。为了避免可能由从不同仪器电接地引起的60Hz噪声,地线从所有电流放大器和所有仪器(放大器和数字转换器)及法拉第笼移出,并人工一起接地到建筑地线。

[0208] 在dsDNA引入顺储器时,在TMV达到~2V时,从纳米孔离子电流信号通道记录间断移位事件。对于纳米线FET信号通道,在电导踪迹以与离子电流测定几乎完美的时间相关记录类似事件。图24A包括对于2.0V TMV的通过纳米孔的测定离子电流的绘图i和测定纳米线FET电导的绘图ii。图24B显示对于2.4V TMV的通过纳米孔的测定离子电流的绘图i和测定纳米线FET电导的绘图ii。随着TMV增加,由通过纳米孔离子电流测定和通过纳米线FET局部电位感测测定的移位事件的时间和频率相应减少和增加。从绘图显示,通过常规离子电流测定,局部电位测定感测方法优选跟踪感测。由此,局部电位测定方法能够测定对象通过纳米孔移位的时间和持续时间。

[0209] 为了直接比较FET局部电位测定信号和纳米孔离子电流测定信号的信号振幅,通过信号乘以150mV源极-漏极电压,使~200nS FET电导信号和~24 μ S基线转化成电流。该计算表明,对于利用~12nA基线通过纳米孔离子电流~2nA变化,放大到利用~3.6 μ A基线纳米线局部电位测定~30nA FET电流。考虑到目前制造方法未对低噪声装置优化,且一般已证明对于SiNW远远较高的信号-噪声比,纳米线FET自身的噪声和信号-噪声比不是这种测定的基本限制因素。

[0210] 实施例V

[0211] 对顺反储器缓冲剂浓度差的局部电位测定依赖性

[0212] 为了确定纳米孔感测器顺反储器中不同离子浓度流体的影响,按照以上实施例III中的步骤构造纳米线-纳米孔结构,但在此顺室和反室两室均用1M KCl缓冲剂代替具有不同缓冲剂浓度的溶液填充。然后,按照以上实施例IV的步骤,利用0.6V TMV,用在反储器中提供的dsDNA进行纳米孔感测器操作。以实施例IV的方式,通过纳米线FET电导,测定通过纳米孔的离子电流,像局部电位一样。

[0213] 图24C提供包括测定离子电导的绘图i和测定FET电导的绘图ii的绘图。如绘图中所示,在TMV达到0.5-0.6V但同时记录FET电导变化在那个电压可忽略时,通过离子电流变化感测移位事件。因此了解,储器溶液浓度比在信号产生中起重要作用。

[0214] 在该试验的平衡缓冲剂溶液浓度条件(1M / 1M)下,纳米孔溶液电阻贡献大部分纳米孔感测器电阻,因此,几乎所有TMV跨纳米孔下降。因此,对于该条件,纳米孔感测器附近的电位很接近地,不考虑由于物质移位期间阻断纳米孔溶液电阻和储器接入电阻的任何变化。在以上实施例IV的不平衡缓冲剂条件(10mM / 1M)下,纳米孔溶液电阻和反室接入电阻可比,而顺室的接入电阻仍可忽略。纳米孔中溶液电阻和反储器中接入电阻的任何变化引起相应TMV再分配,和在反室邻近纳米孔电位的变化,这一电位变化是容易通过纳米孔感测器局部电位测定检测的。

[0215] 该实施例验证本文发现,局部电位测定纳米孔感测优选利用纳米孔感测器的储器之间缓冲剂溶液浓度差进行,且局部电位测定要在具有较高电阻或相应较低浓度的纳米孔储器侧进行。该条件不适用于其中薄膜足够薄作为纳米线操作和感测在薄膜两侧电位的纳米孔感测器,如同其中石墨烯纳米线提供在纳米孔两侧电位之间差异指示的石墨烯纳米孔感测器。在此情况下,缓冲剂溶液浓度差仍是优选的,但局部电位测定不严格限于纳米孔一

侧或另一侧,假定纳米线测定内在感测在薄膜两侧的电位。

[0216] 应注意到,在其中储器溶液浓度相等或不相等的以上试验中,对初始移位通过纳米孔需要不同跨膜电压。对于反储器中的电位测定,利用相等溶液浓度,通过纳米孔的电场是恒定的,如图3D绘图中所示。在储器浓度不同时,例如,以上实施例的100:1浓度,通过纳米孔的电场在纳米孔的顺储器侧较小。为了产生与用相等储器溶液浓度得到相同的电场,需要跨膜电压增加约4倍。这解释图23和24绘图的数据。

[0217] 实施例VI

[0218] 多通道纳米孔感测

[0219] 按照以上实施例的方法,构造三个纳米线纳米孔感测器。这三个纳米孔感测器与普通储器系统集成,在顺室中利用1M KCl缓冲剂溶液,在反室中利用10mM KCl缓冲剂溶液。为了移位通过纳米孔,利用3V跨膜电压,并提供1.4nM pUC19 DNA。

[0220] 图25分别提供三个纳米孔感测器各自在DNA纳米孔移位操作期间总离子电流和纳米线FET电导的绘图i-iv。如绘图中所示,在所有三个纳米孔感测器和总离子电流通道中观察到连续移位事件。所有独立操作的纳米孔感测器和离子电流通道中明显的每个下降或上升边缘可唯一地与三个纳米孔感测器之一的相应边缘相关。使用来自要重建总离子电流踪迹的所有三个纳米孔感测器的信号的下降和上升边缘,对于所有事件,重建都几乎是完美的。该纳米孔操作证明,纳米孔感测器的关键优点是大规模集成能力。可执行多个独立纳米孔感测器,不需要复杂微流体系统。

[0221] 实施例VII

[0222] 利用流体通道的纳米孔感测器

[0223] 按照以上实施例的方法,构造纳米线纳米孔感测器。在流体储器和纳米孔之间连接的介电材料中包括1 μ m直径、50 μ m长流体通道。在纳米线中在纳米线通道中约100nm孔在脂质双层中布置蛋白纳米孔。蛋白纳米孔具有约1.5nm直径和4.5nm长度有效几何形状。在顺储器中提供1.6M离子溶液,在反储器中提供1mM离子溶液。为了电泳驱使ssDNA通过纳米孔,跨纳米孔施加300mV偏压。

[0224] 在ssDNA移位前,在通道底部,流体通道的电位测定为150mV,跨纳米孔的电压为150mV。在ssDNA移位通过纳米孔时,有效纳米孔直径为1.12nm,在流体通道底部的电位测定为128mV,跨纳米孔的电压为172mV。相当于ssDNA移位的测定电压信号为22mV。该信号在流体通道底部在FET感测表面均匀分布,且不随生物纳米孔在脂质膜内移动改变。

[0225] 用这些实施例和以前描述证明,纳米孔感测器可提供物质移位通过纳米孔的感测,并且可在那些对象移位通过纳米孔时在不同对象之间区分,例如DNA碱基。该纳米孔感测器不限于感测特定物质或物质种类,可用于宽范围应用。应认识到,这种纳米孔感测器特别好地适合感测为移位通过纳米孔提供的生物聚合物分子。此类分子包括例如核酸链,例如DNA链、寡核苷酸或单链DNA区段、核苷酸、核苷、多肽或蛋白、一般氨基酸或其它生物聚合物链。对要由纳米孔感测器感测的物质对象没有特别限制。利用不同储器溶液浓度、流体通道结构或这两个特征的一些组合证明,纳米孔感测器可用区分DNA碱的合理带宽和灵敏度操作,因此,能够DNA测序。

[0226] 应认识到,本领域的技术人员可在不脱离对本领域贡献的精神和范围下对上述实施方案作出各种修改和附加。因此,应了解,寻求由此提供的保护应认为扩展到主题权利要

求及其相当在本发明范围内的所有等同者。

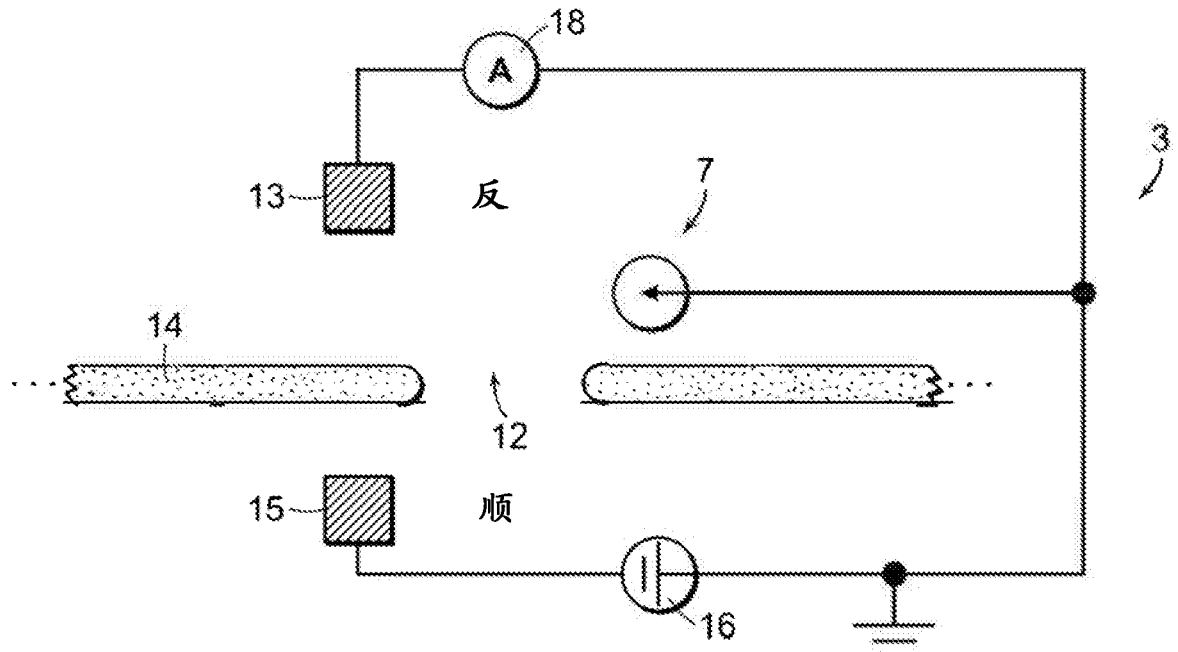


图 1A

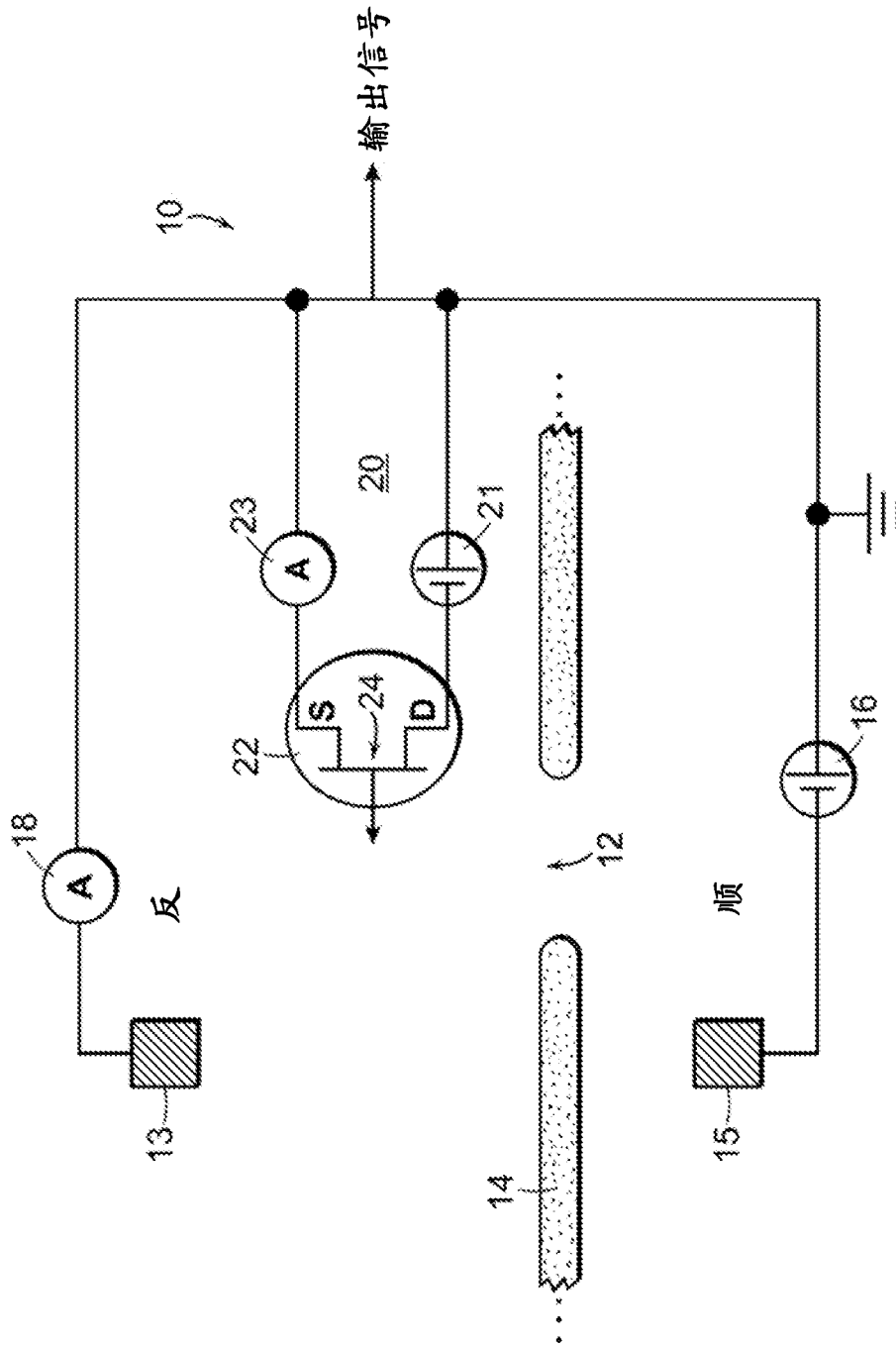


图 1B

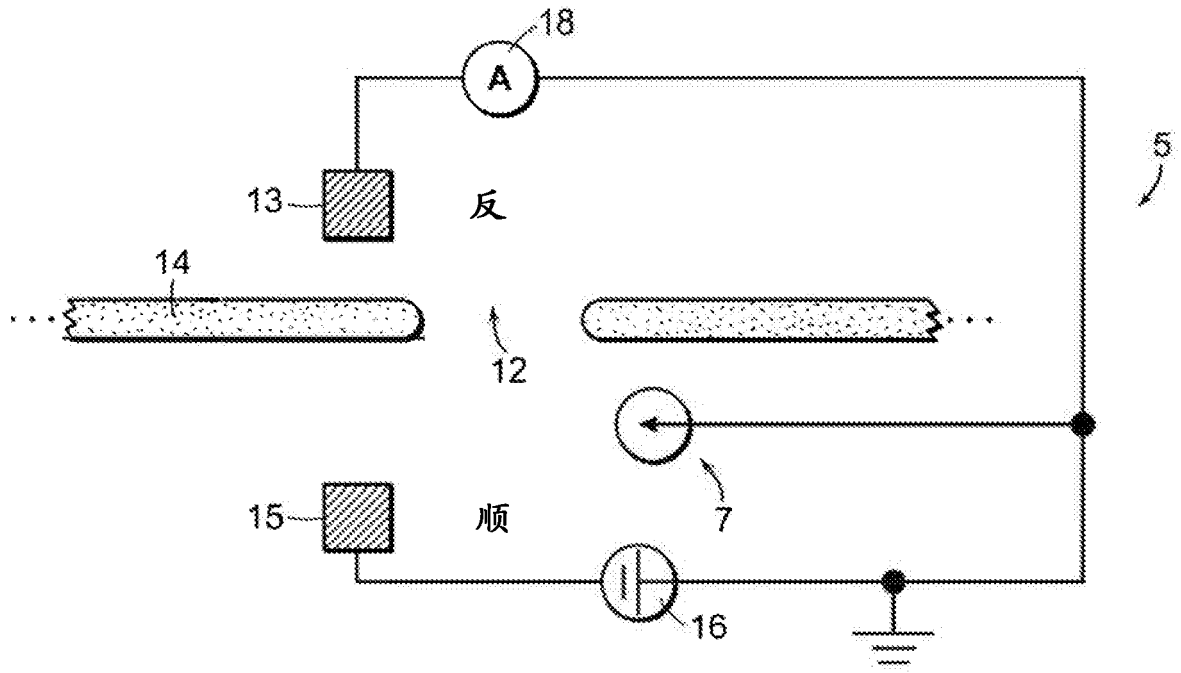


图 1C

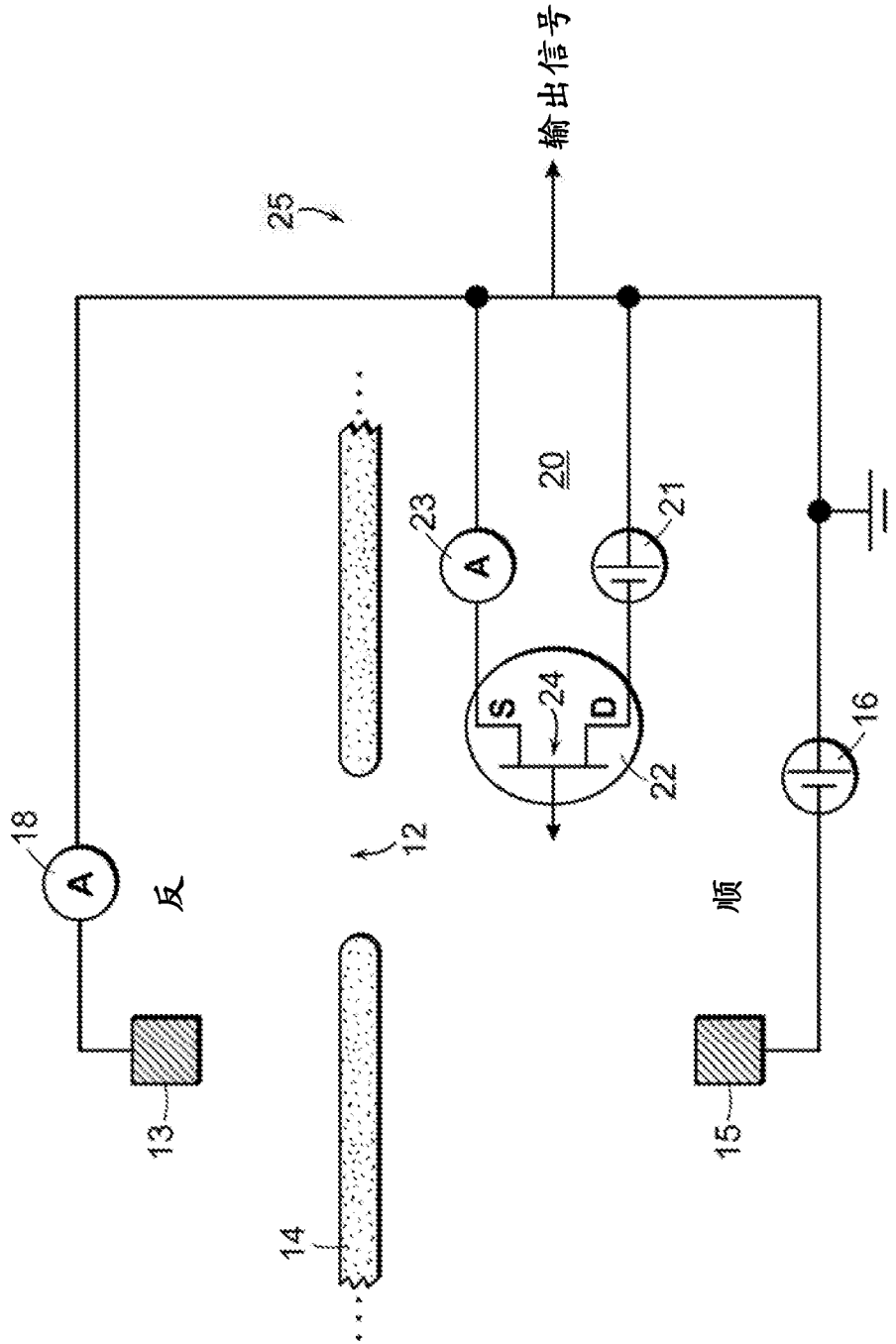


图 1D

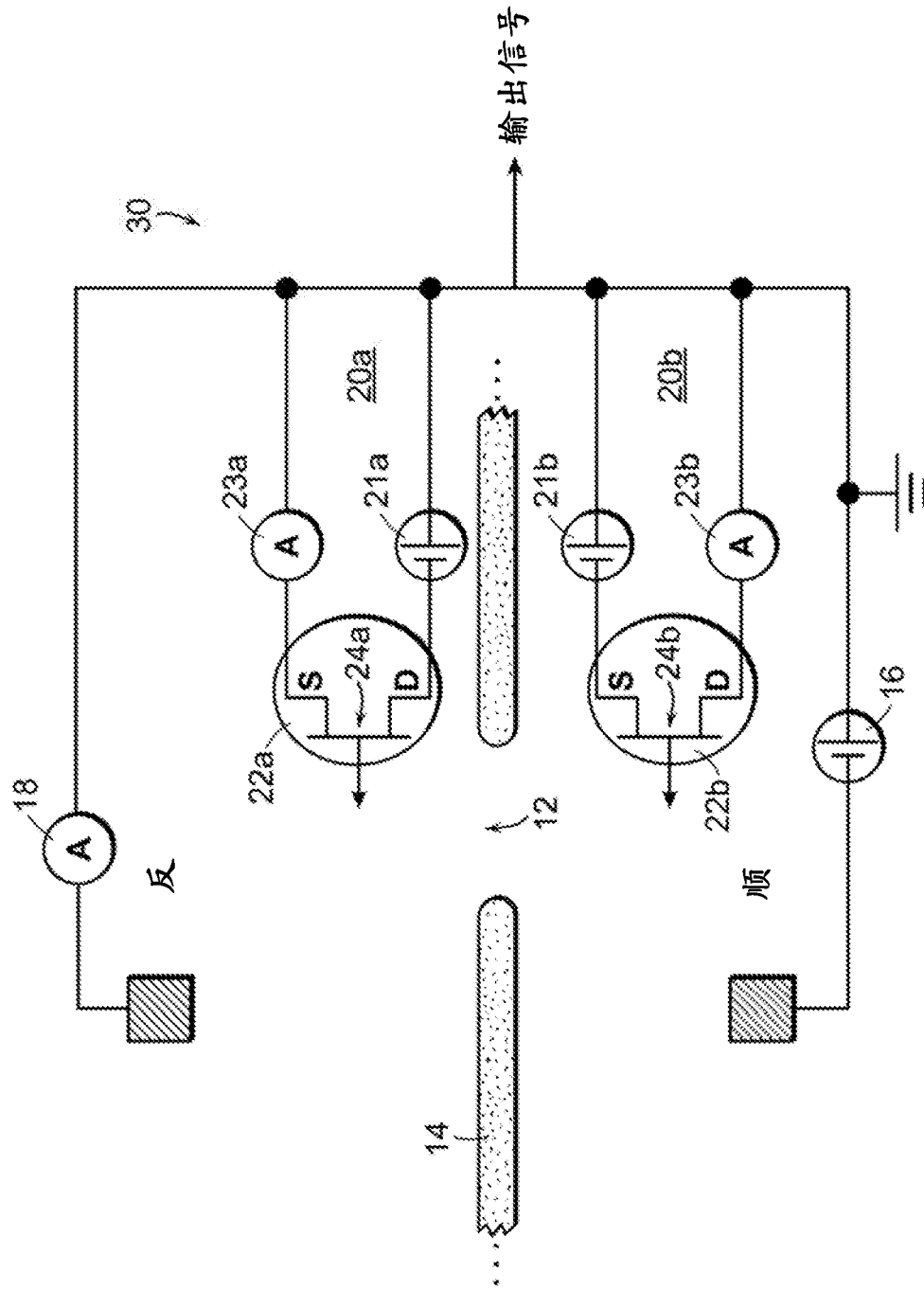


图 1E

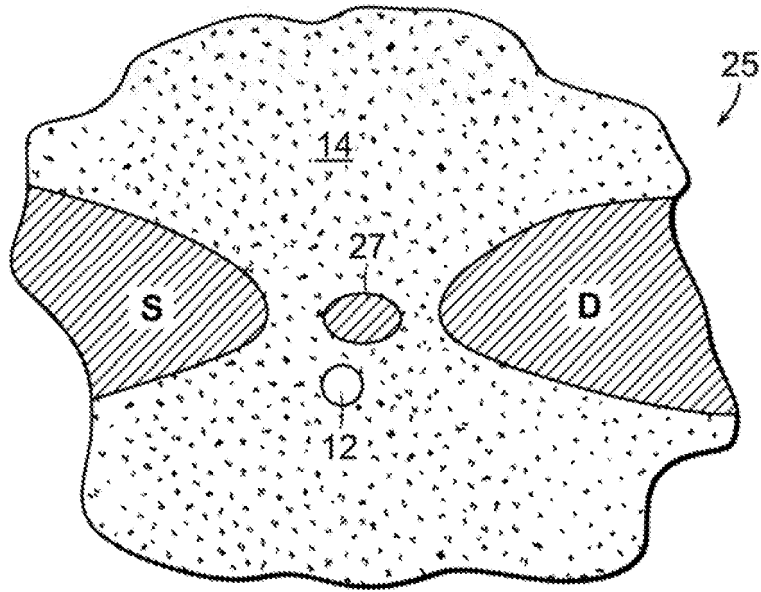


图 1F

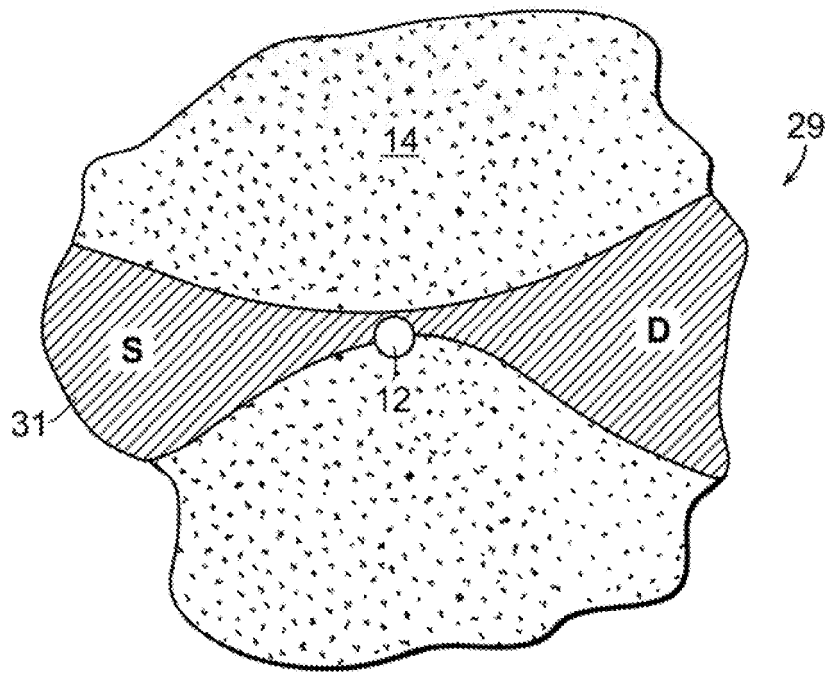


图 1G

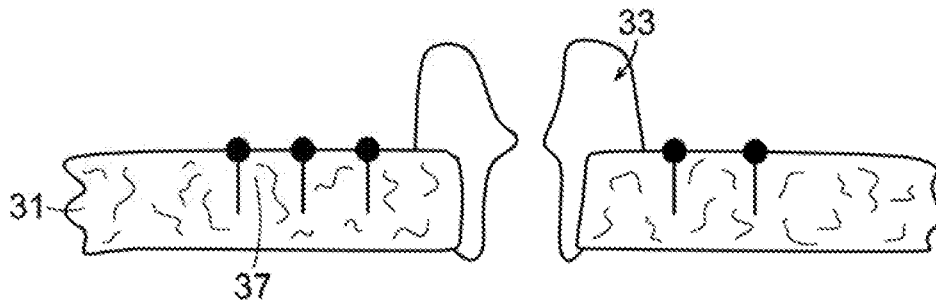


图 1H

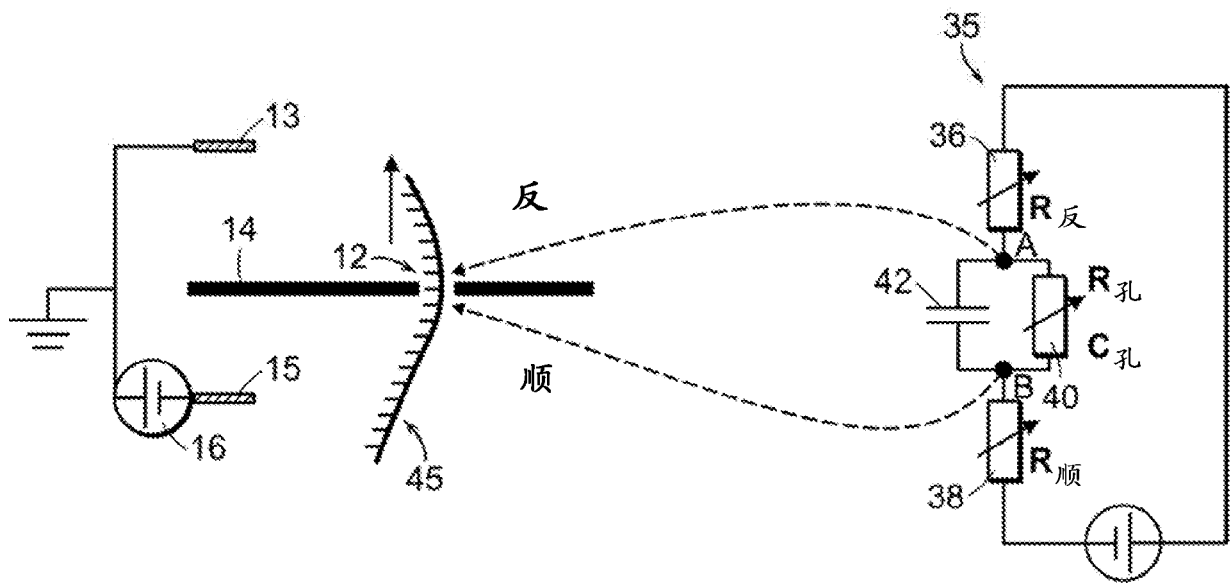


图 2A

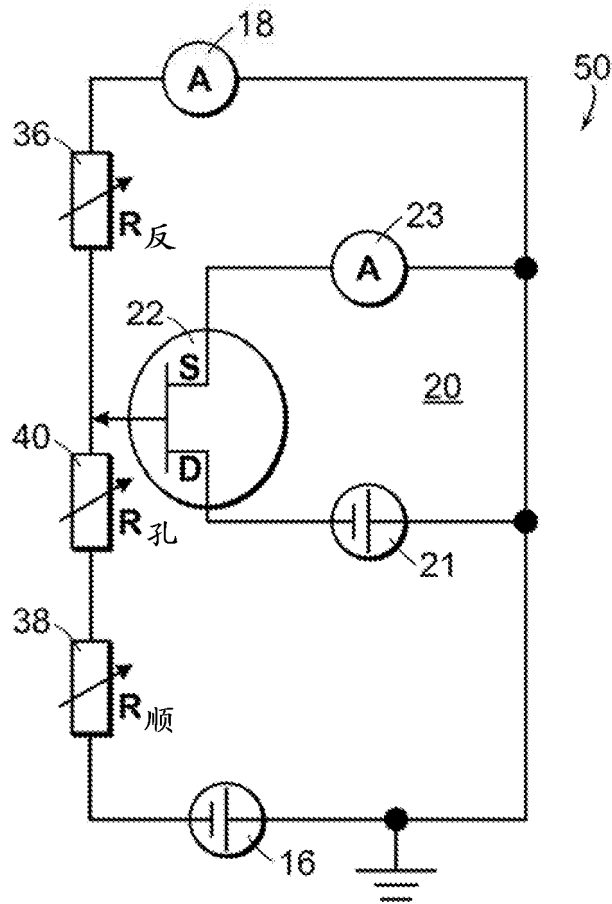


图 2B

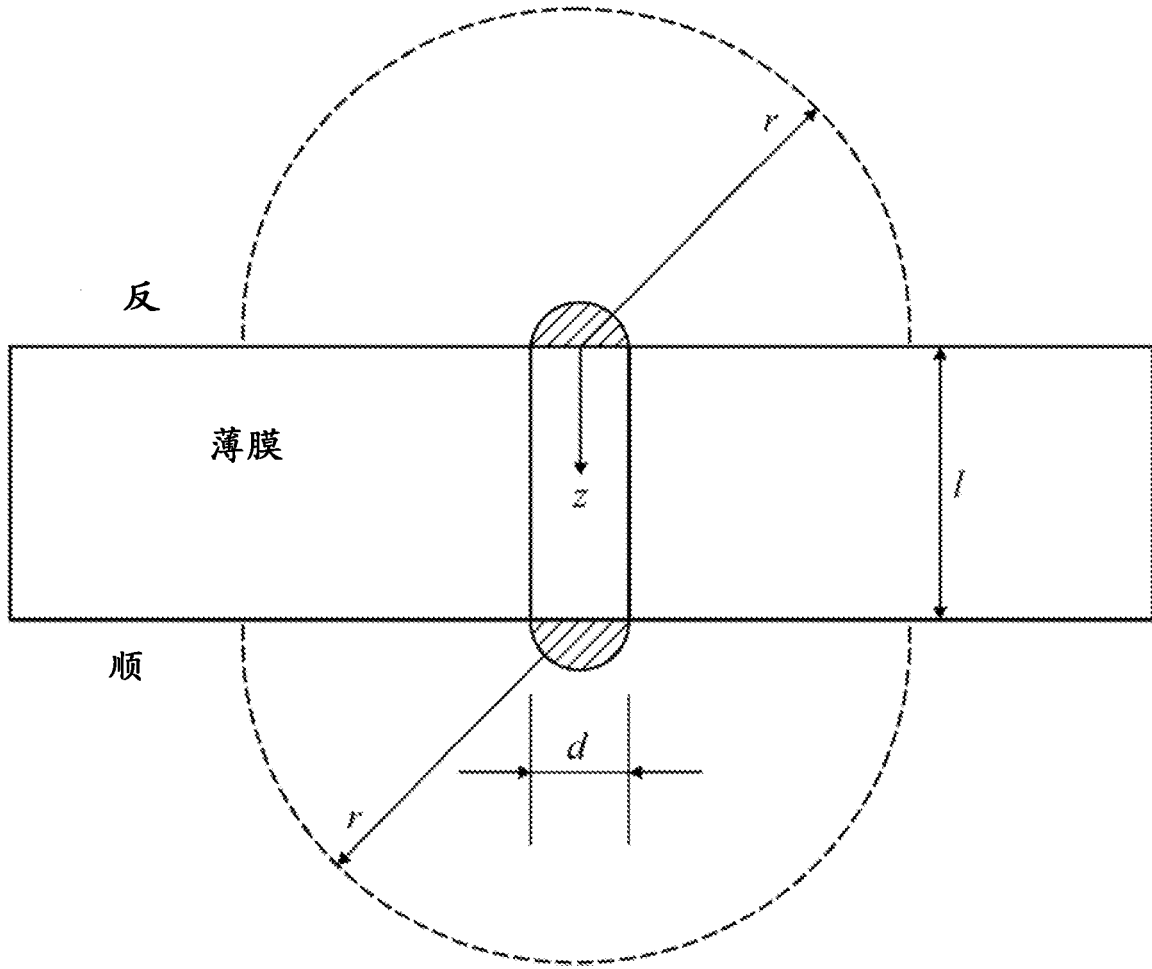


图 3A

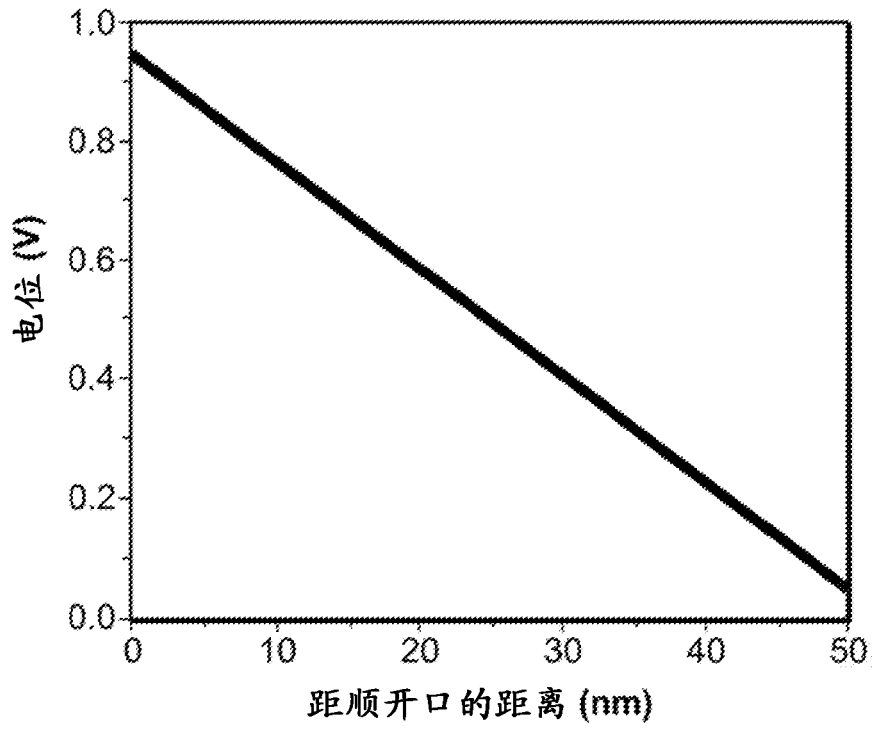


图 3B

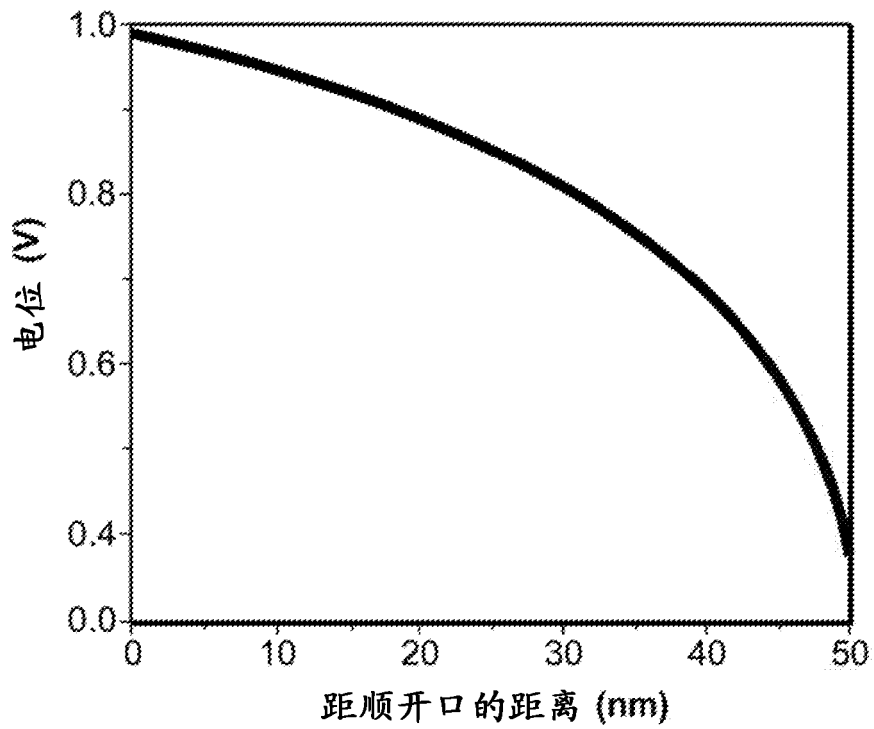


图 3C

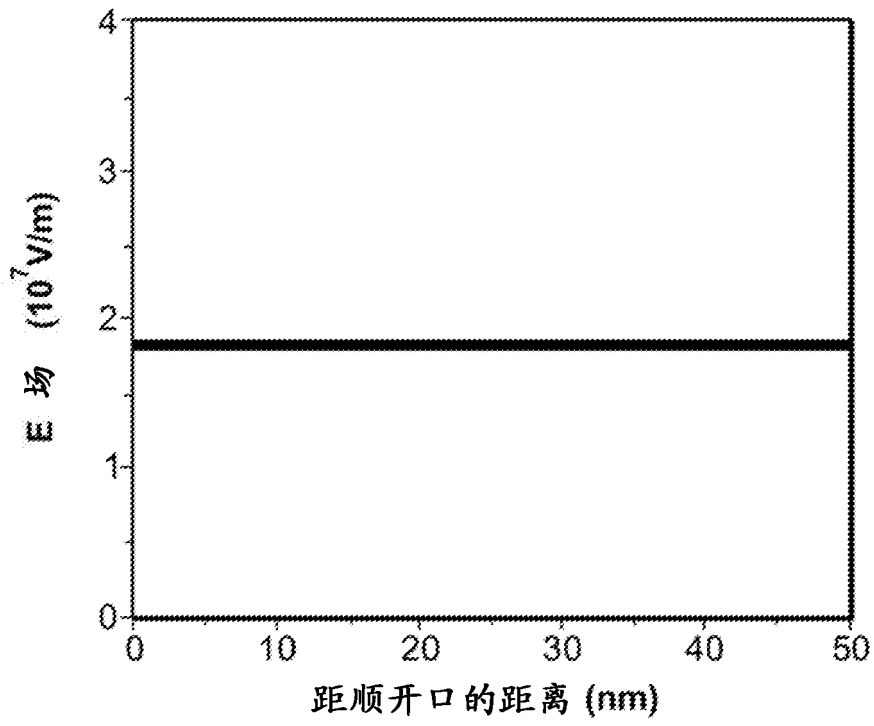


图 3D

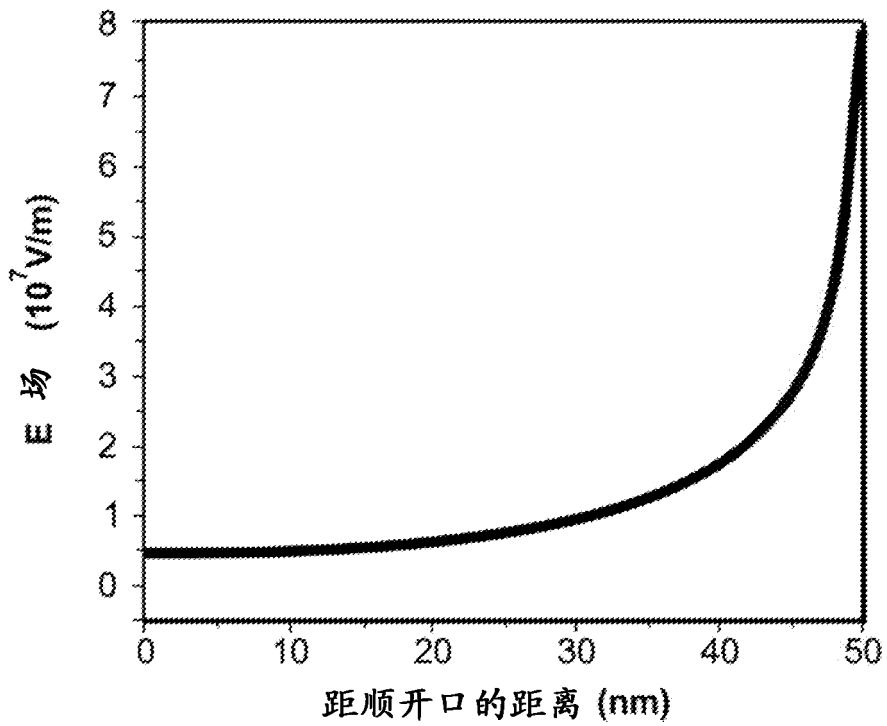


图 3E

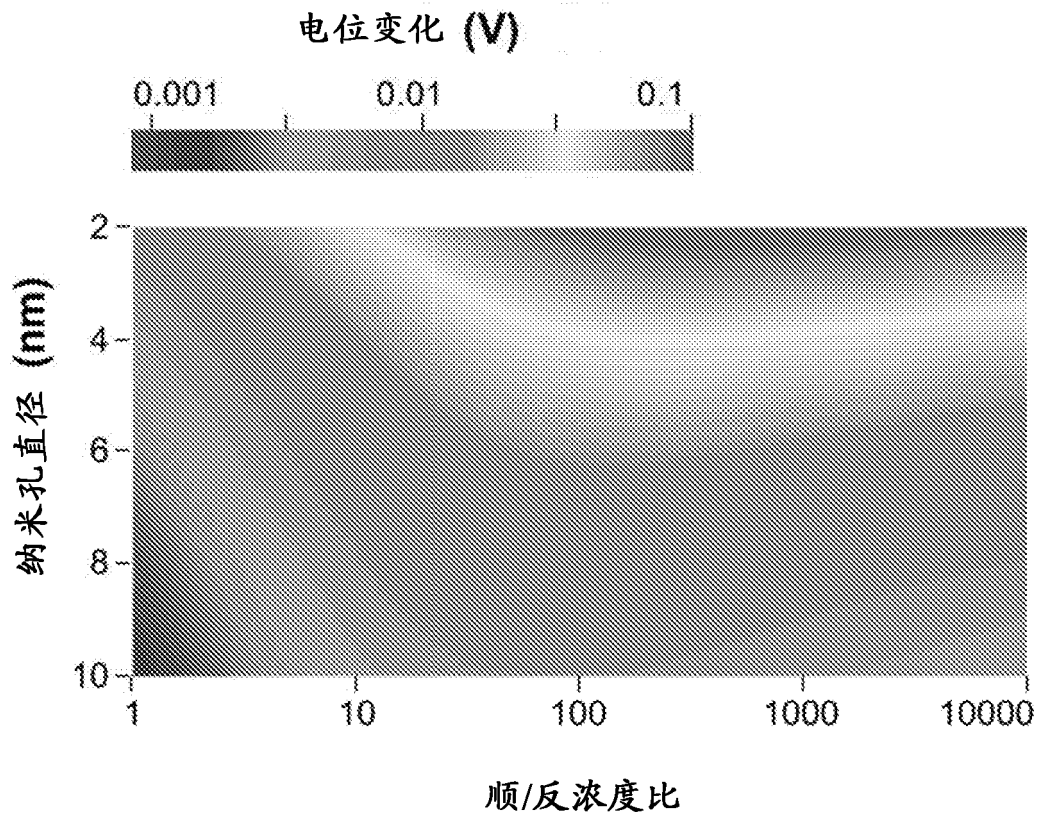


图 4A

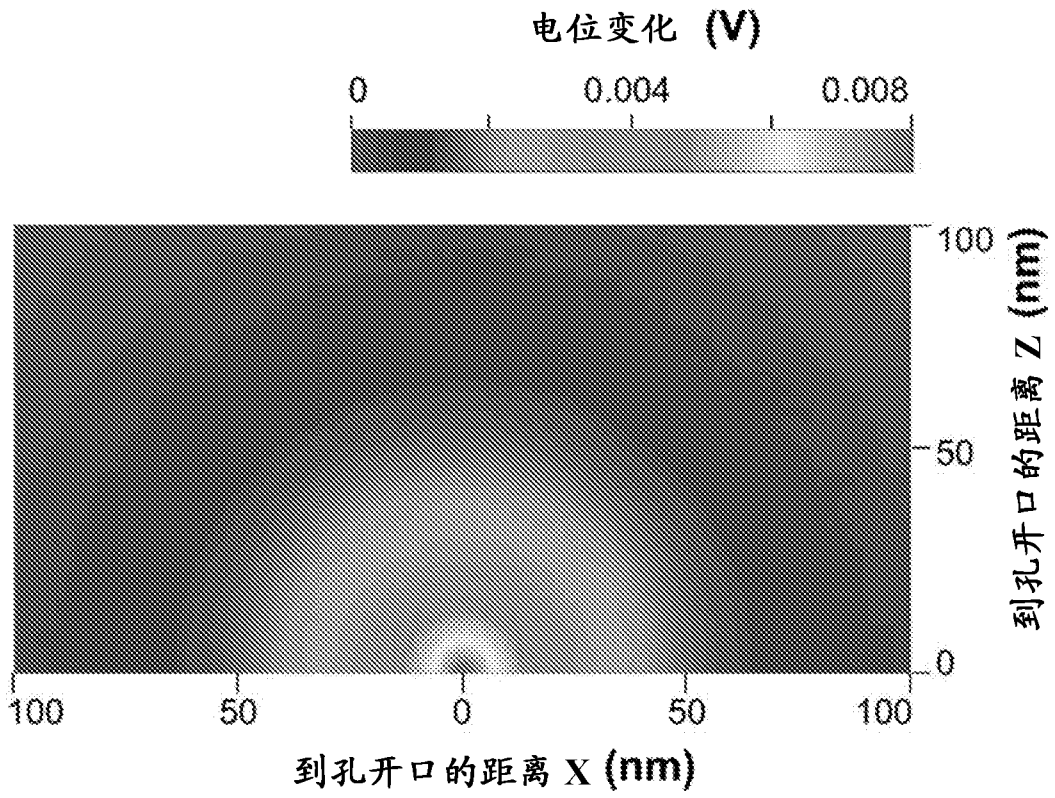


图 4B

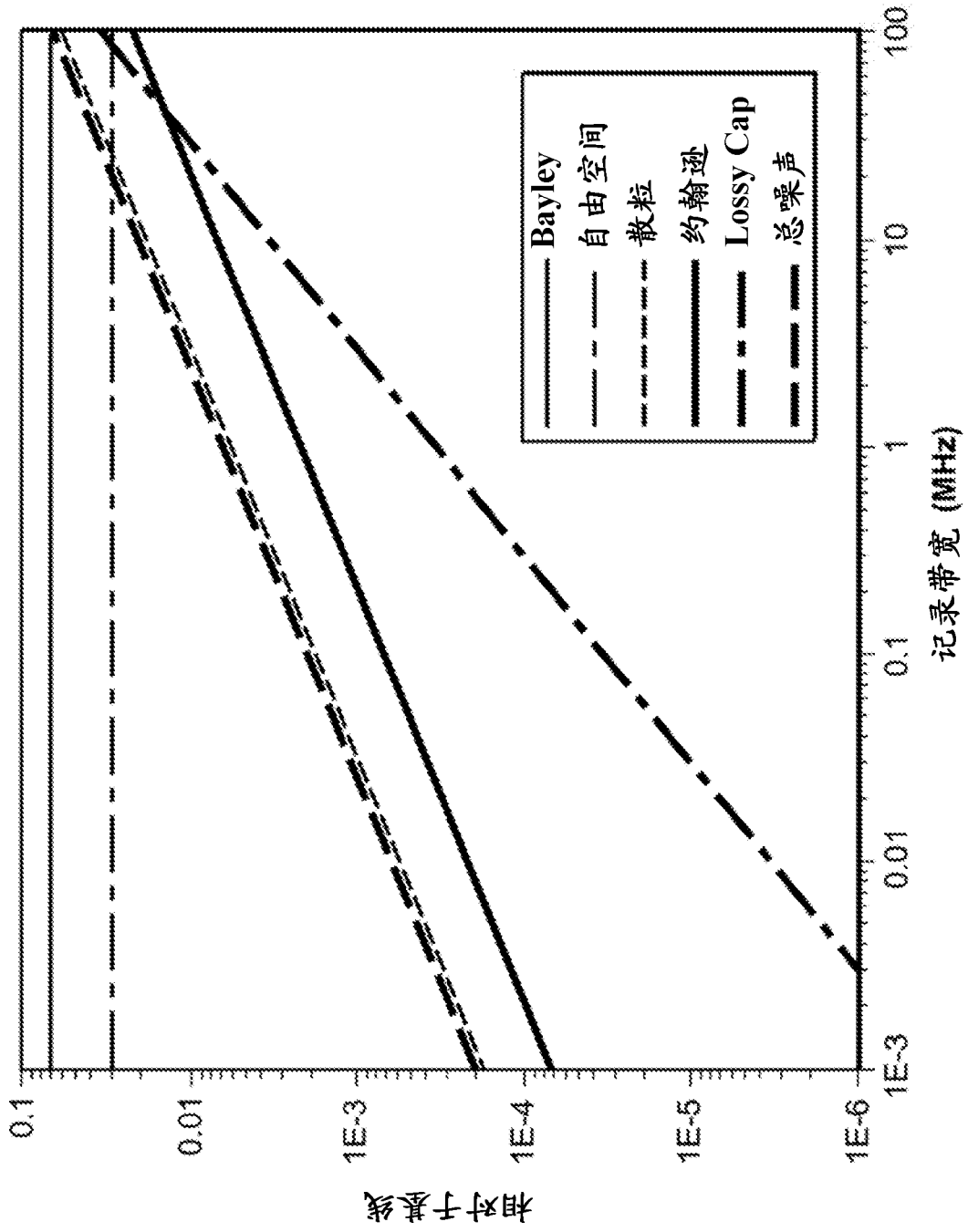


图 4C

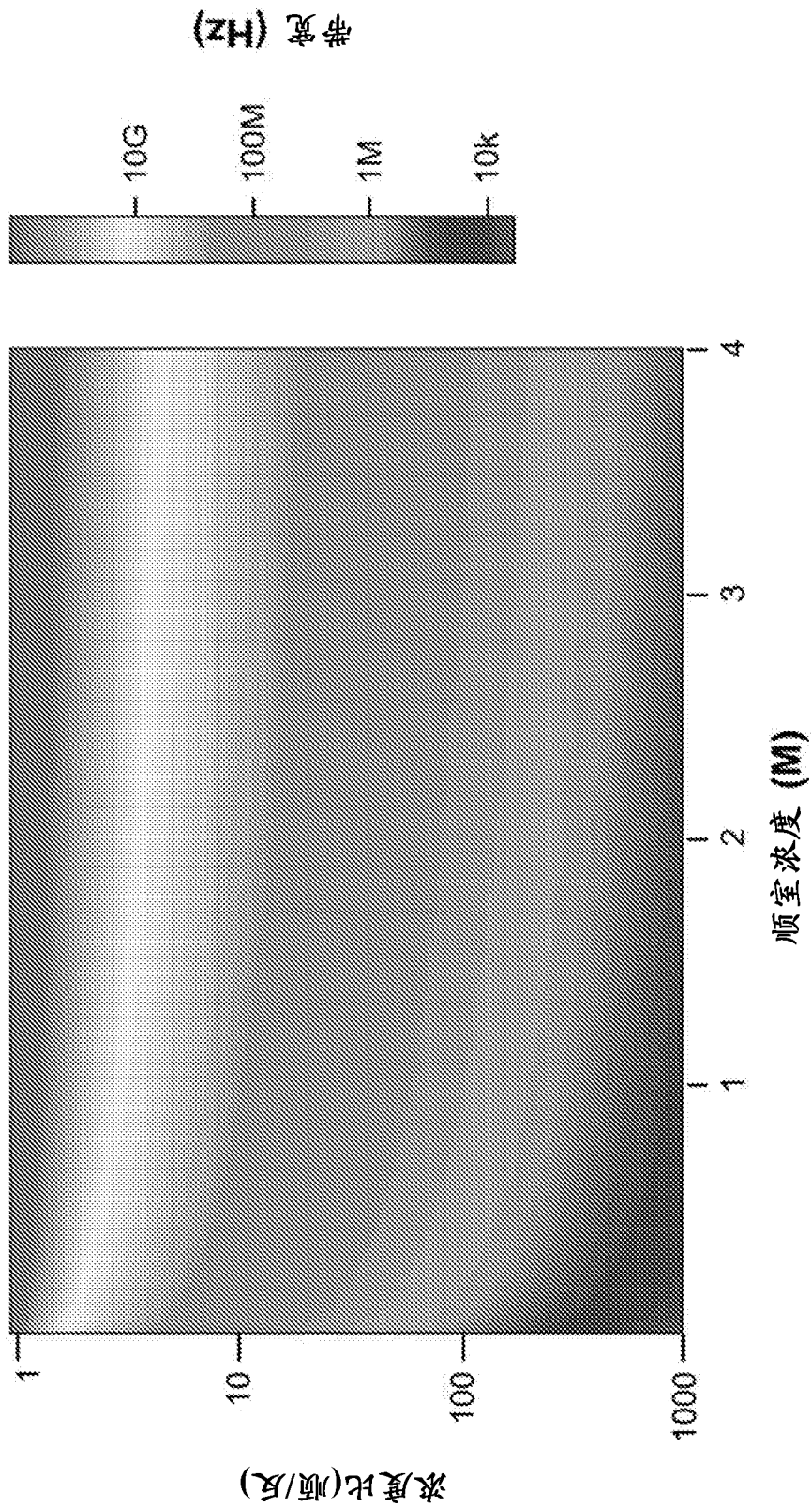


图 4D

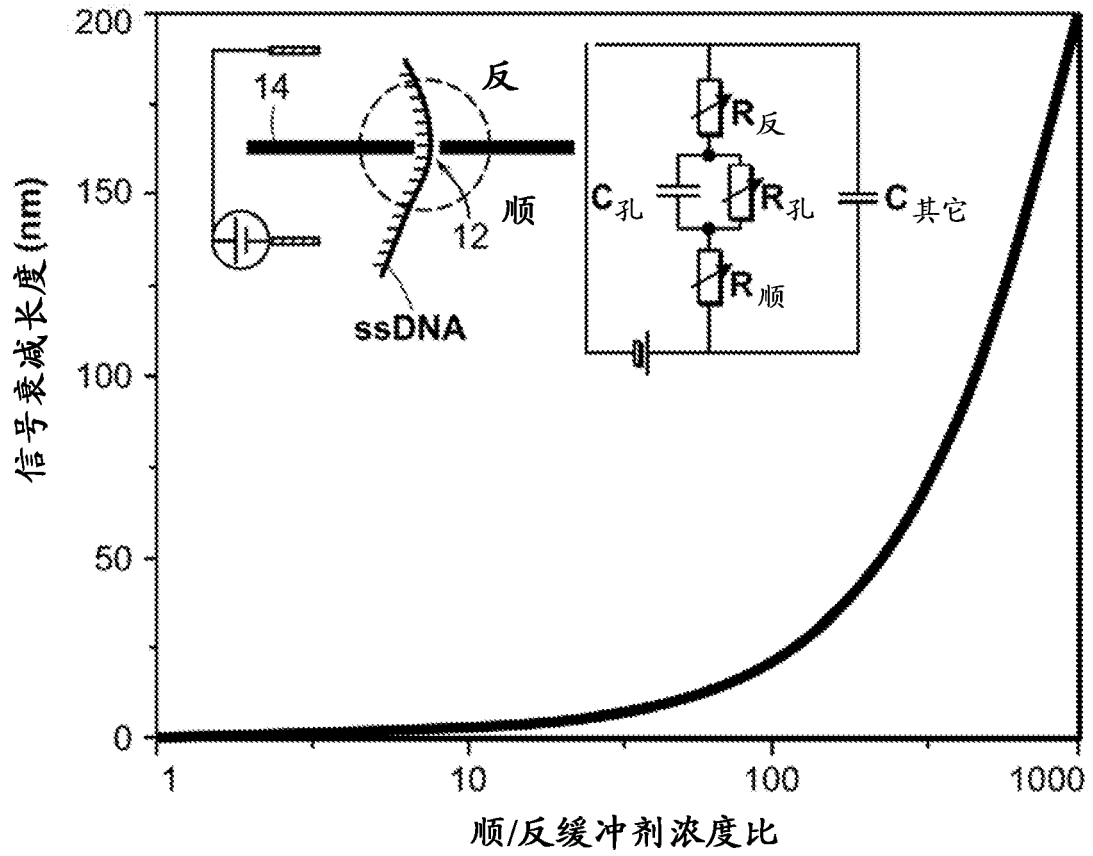


图 4E

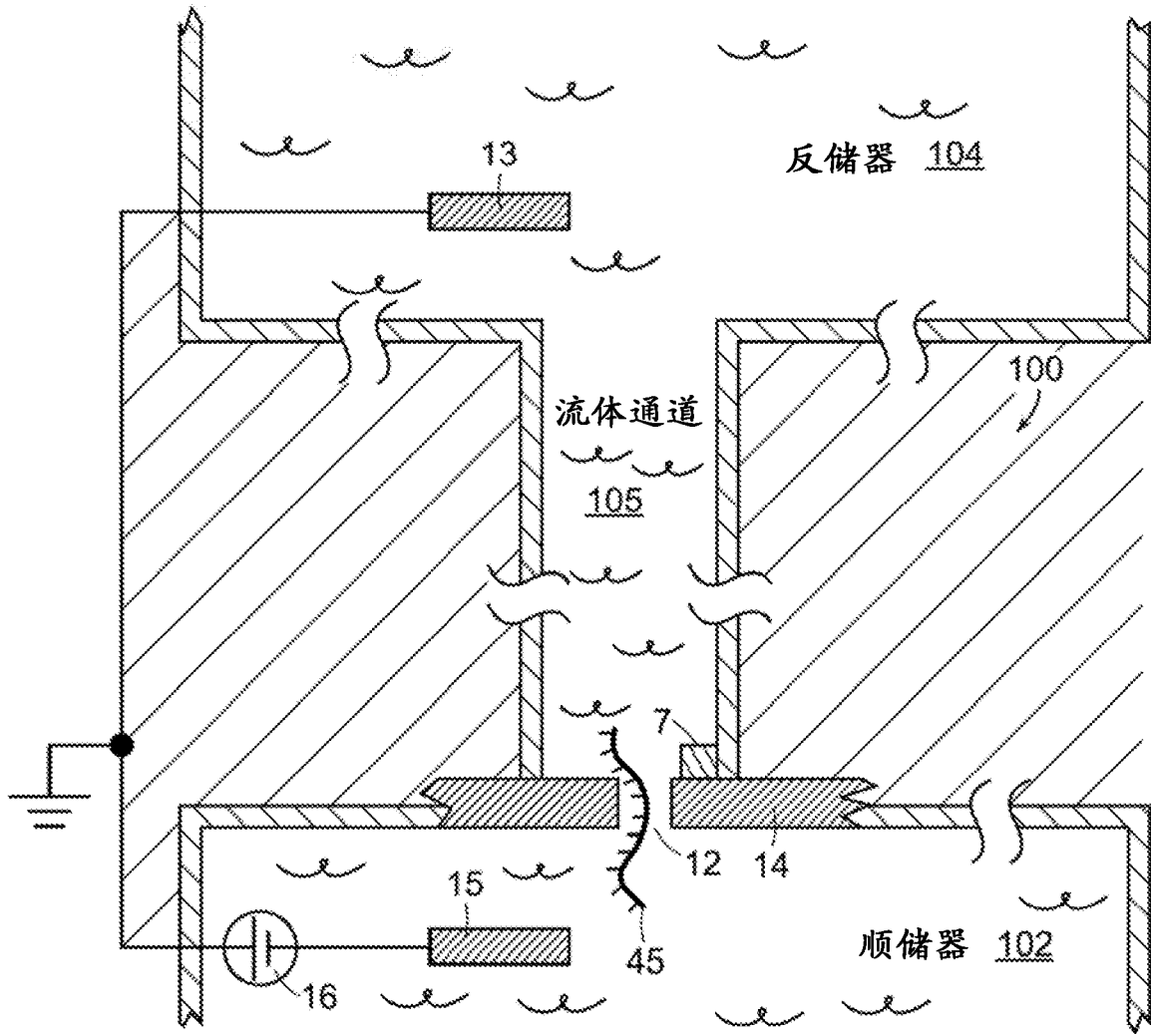


图 5

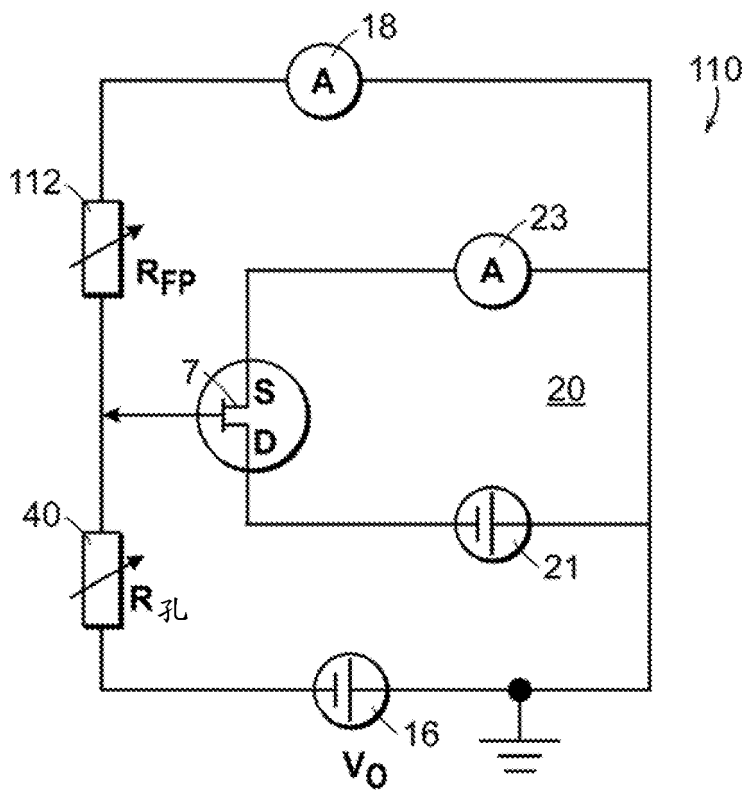


图 6

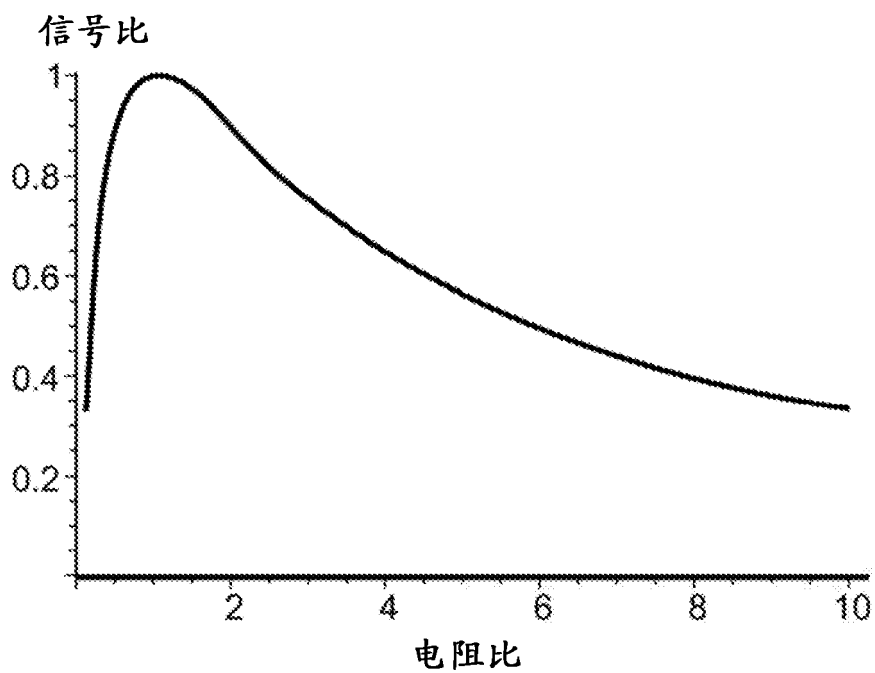


图 7

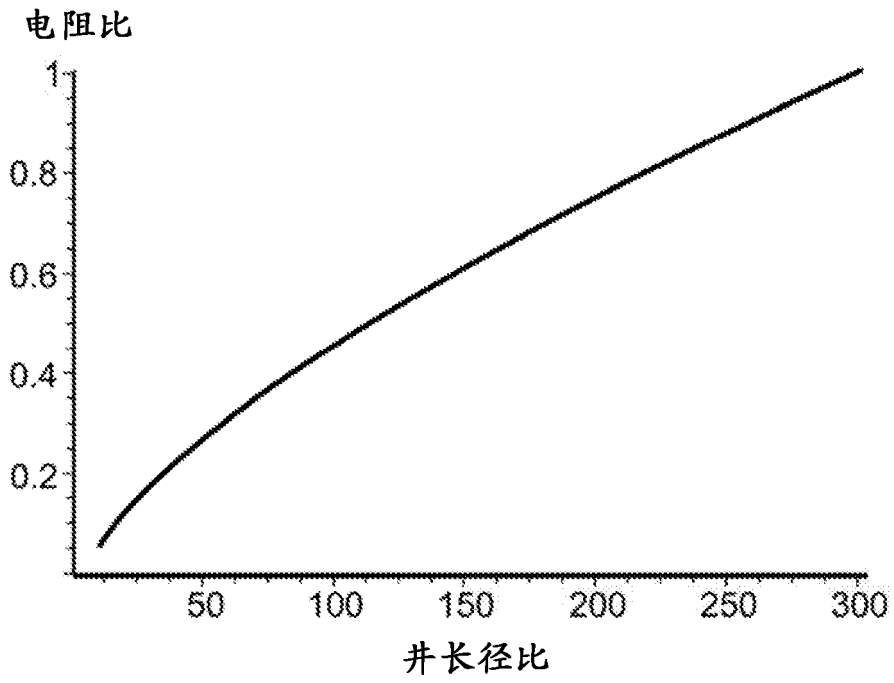


图 9

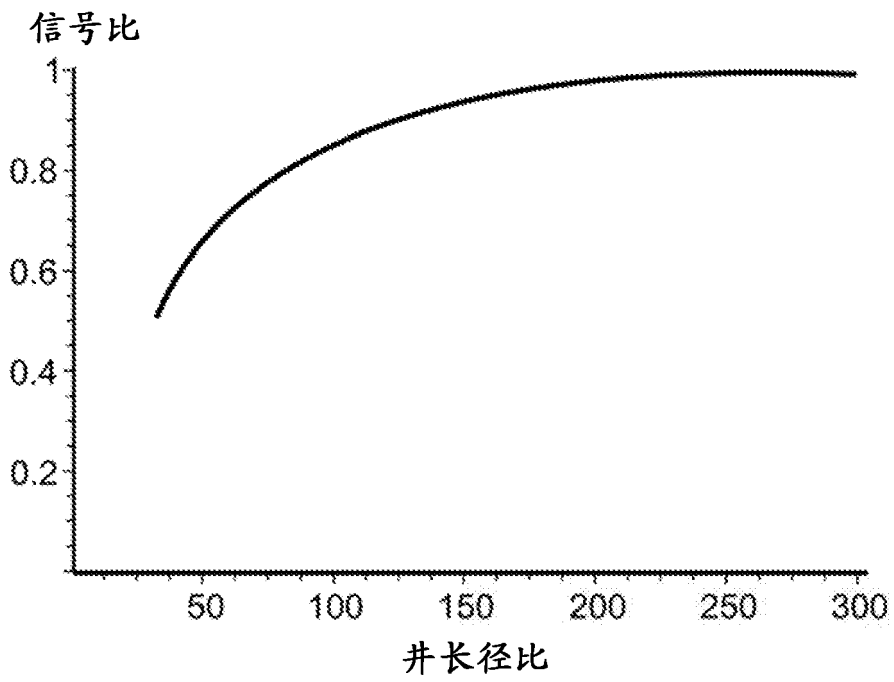


图 10

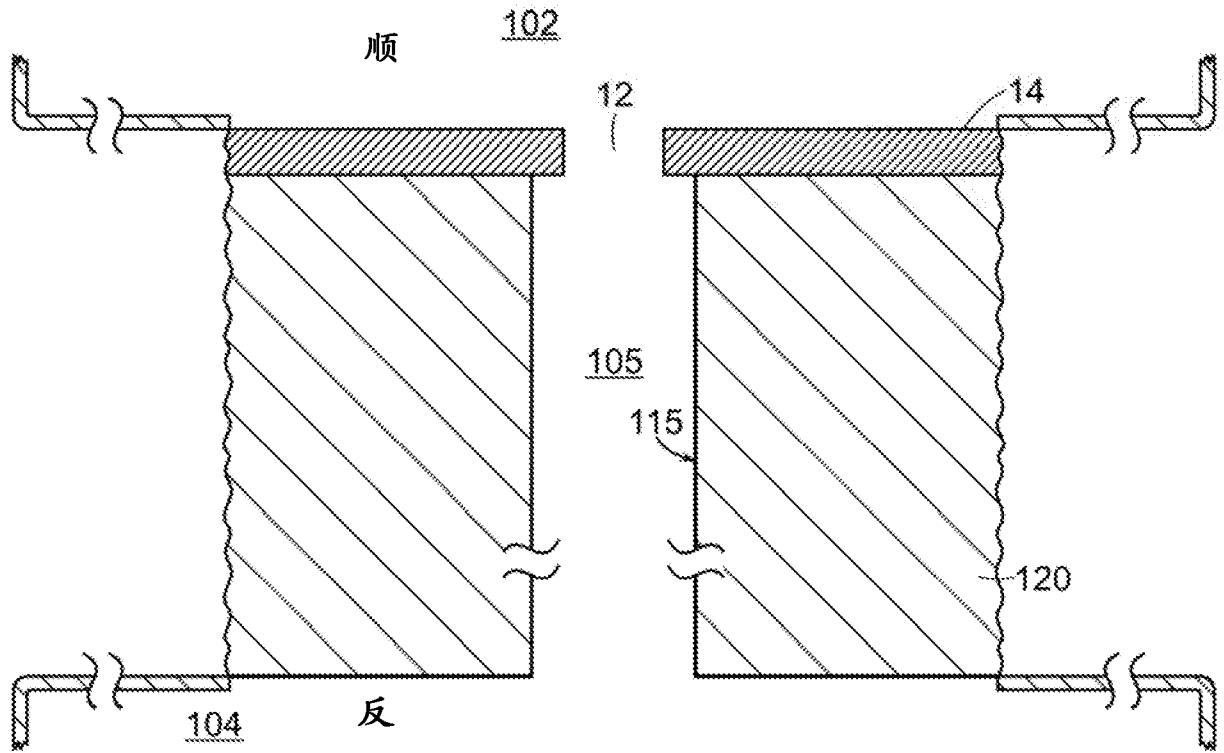


图 11

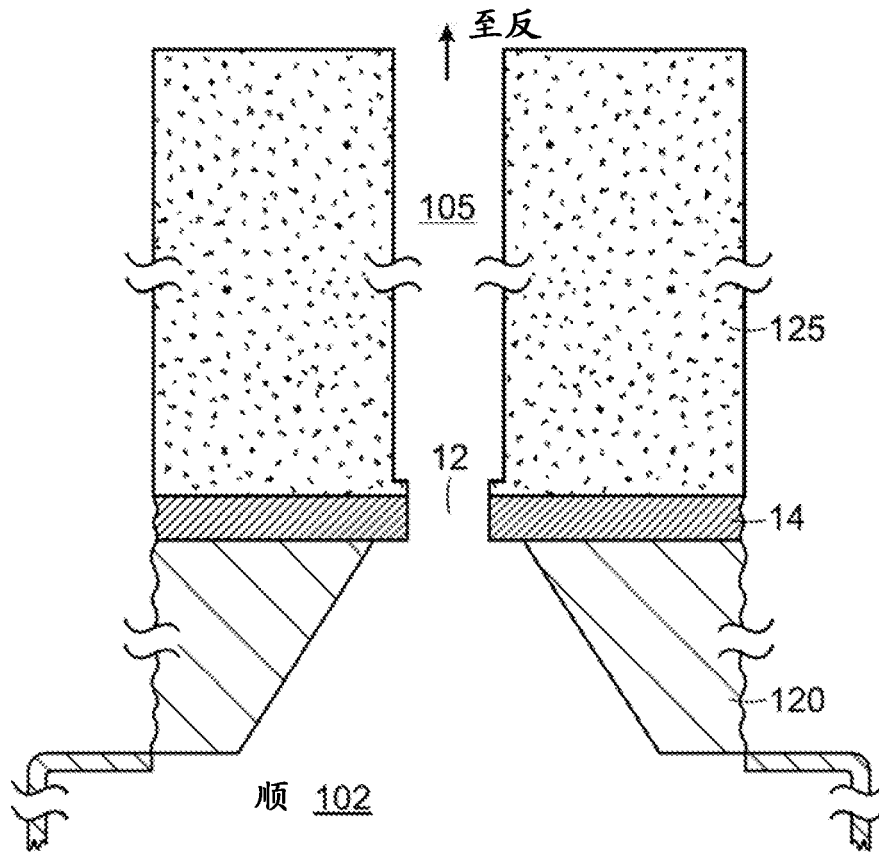


图 12

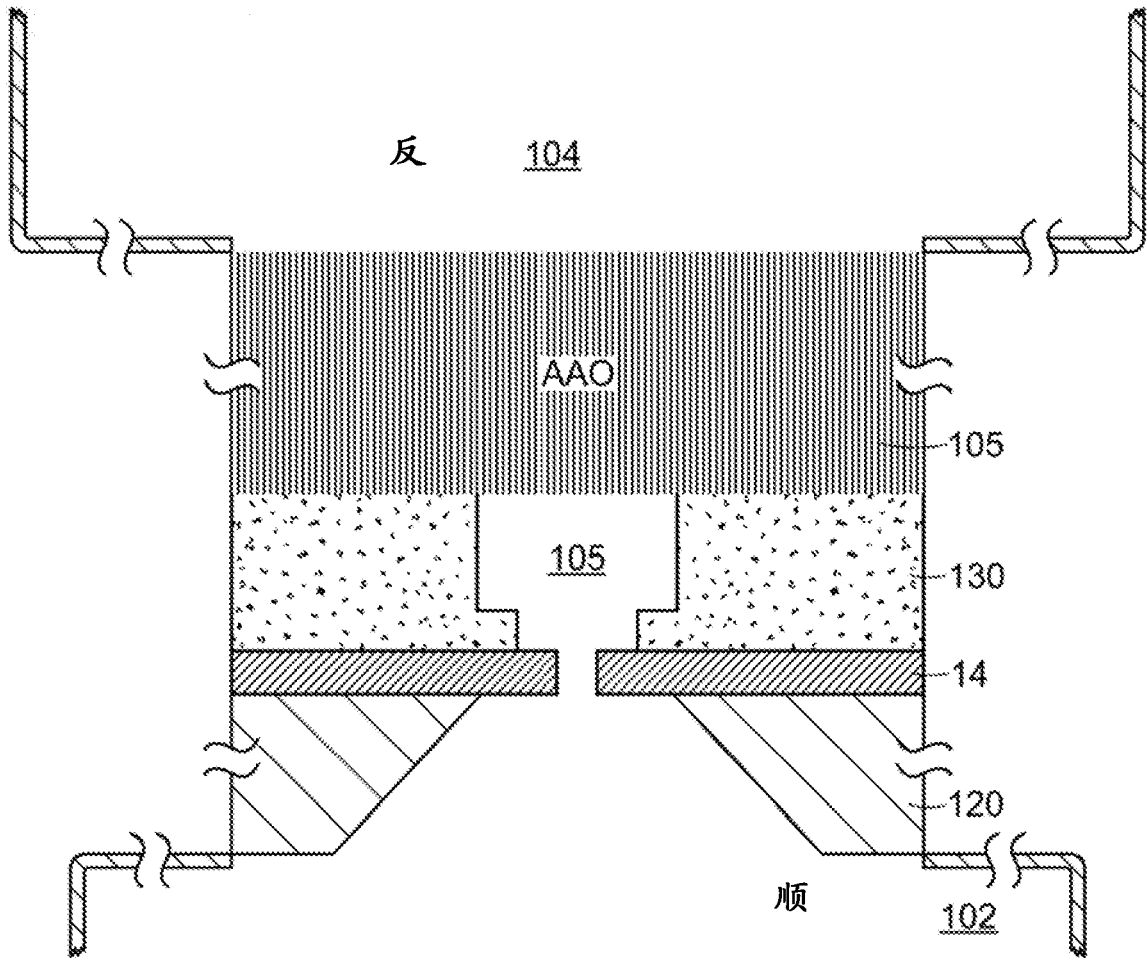


图 13

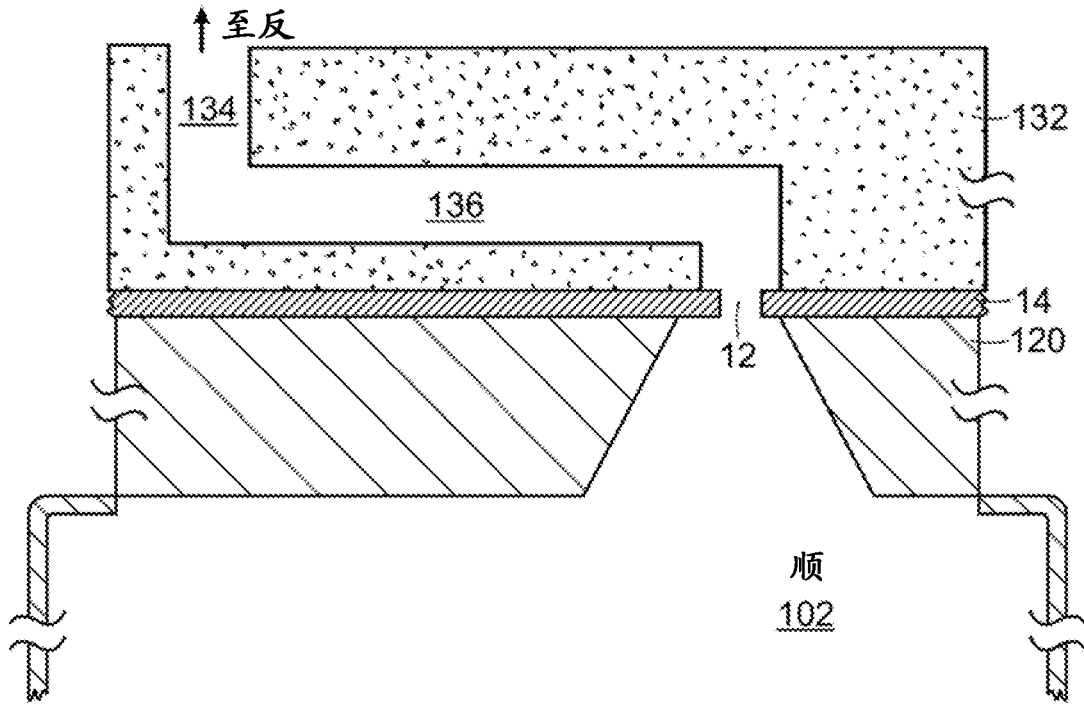


图 14

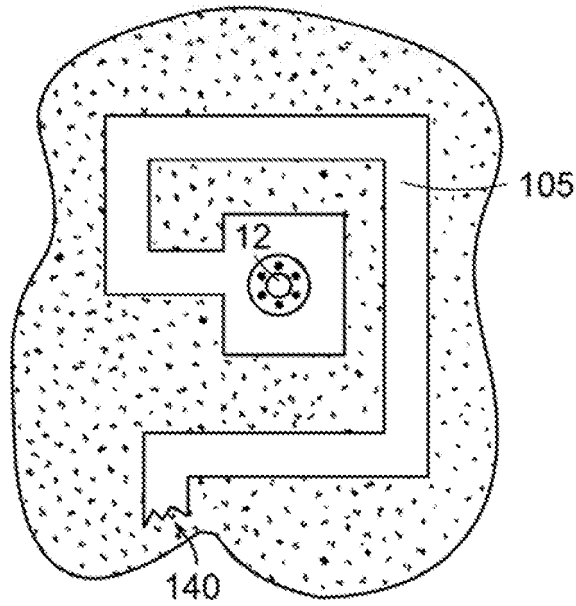


图 15A

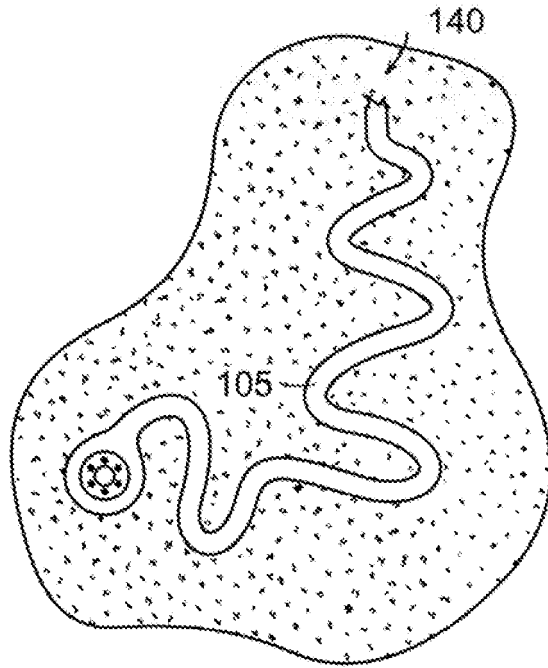


图 15B

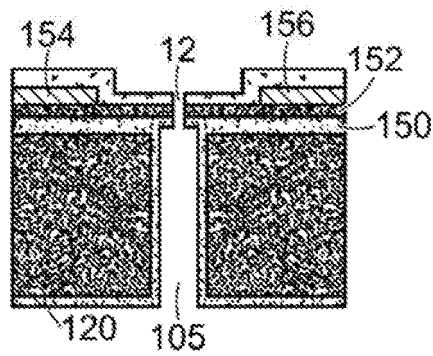


图 16A

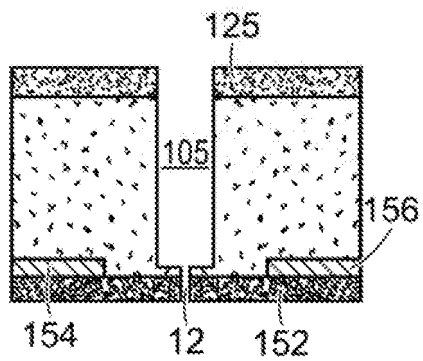


图 16B

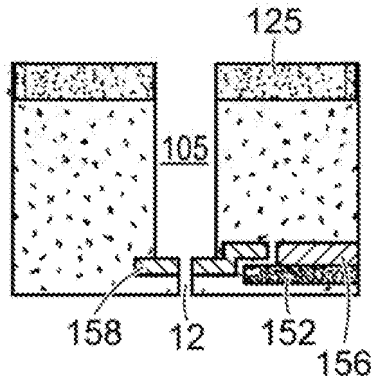


图 16C

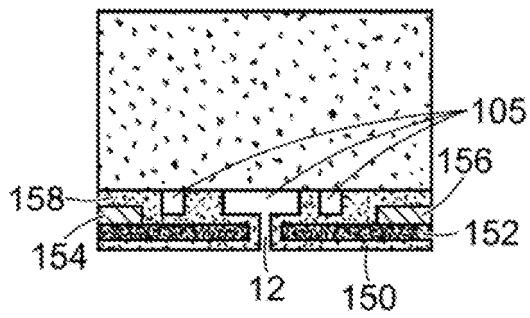


图 16D

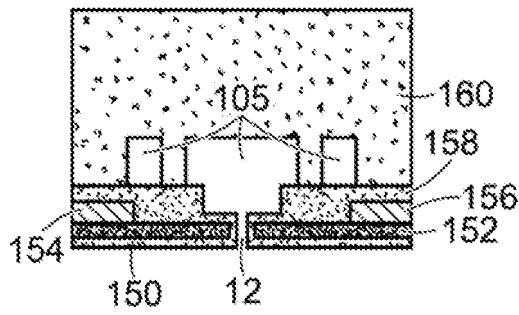


图 16E

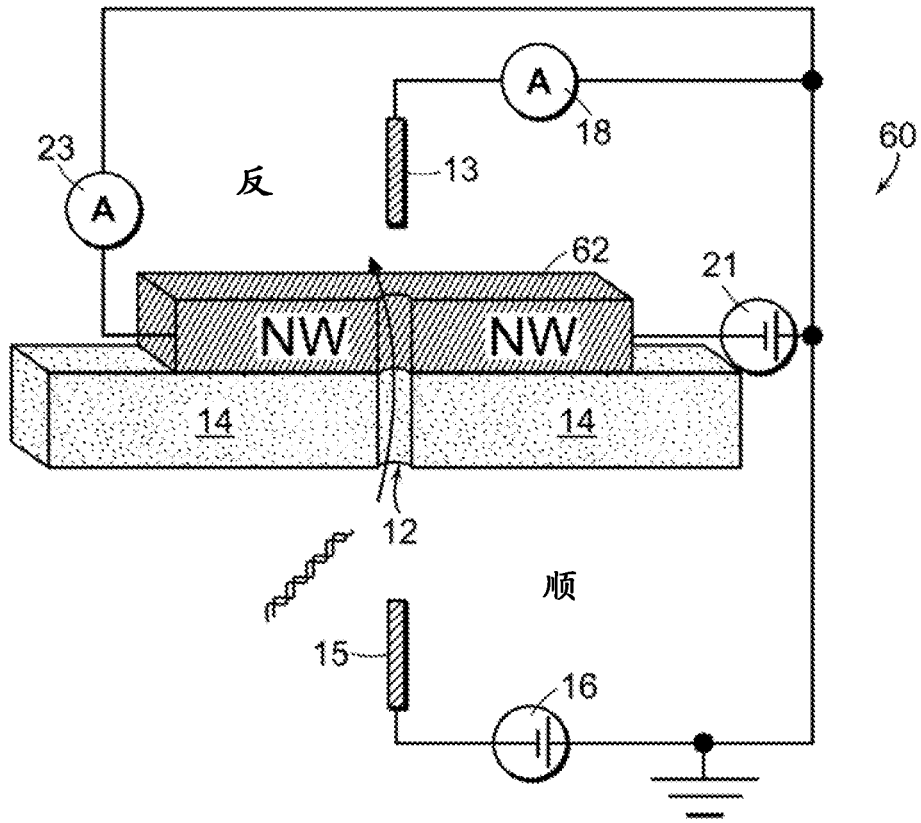


图 17

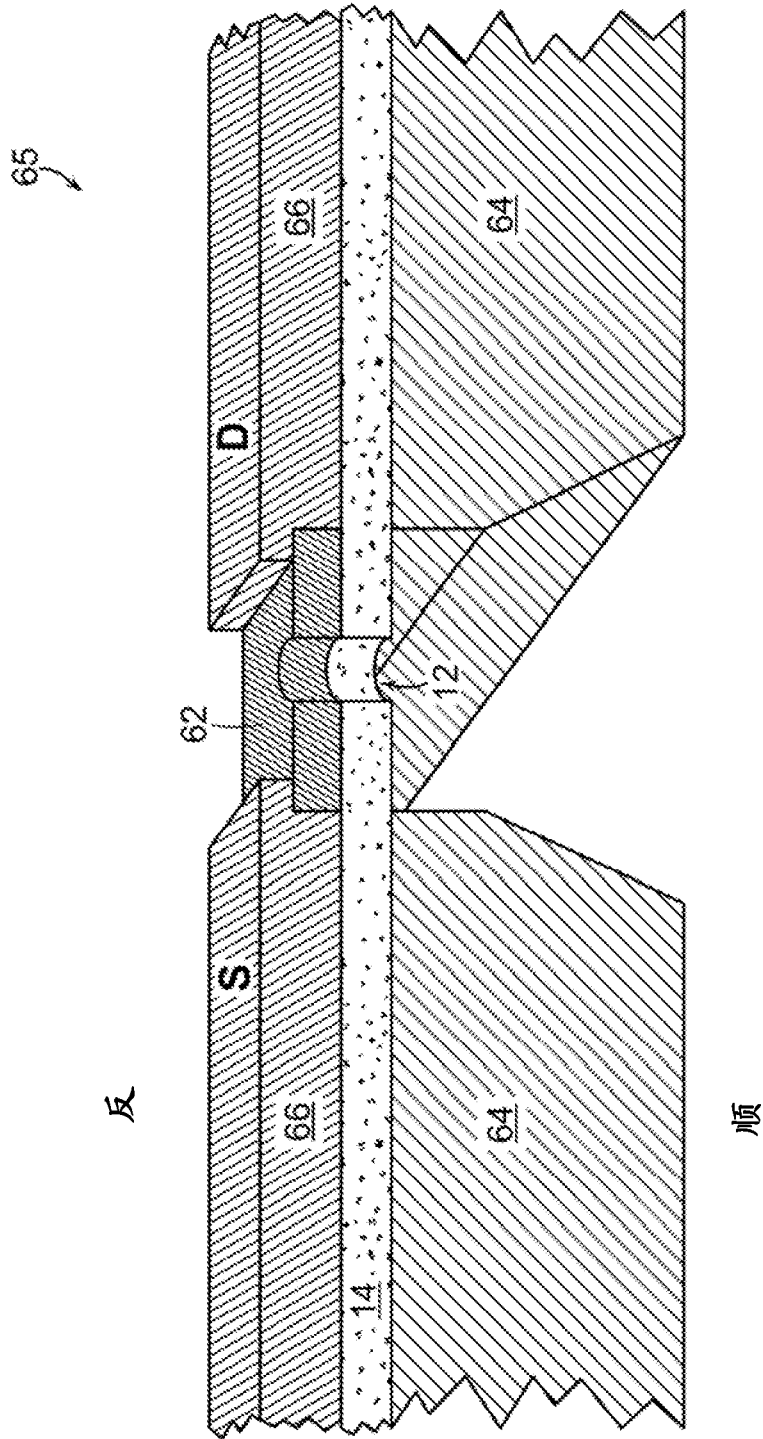


图 18

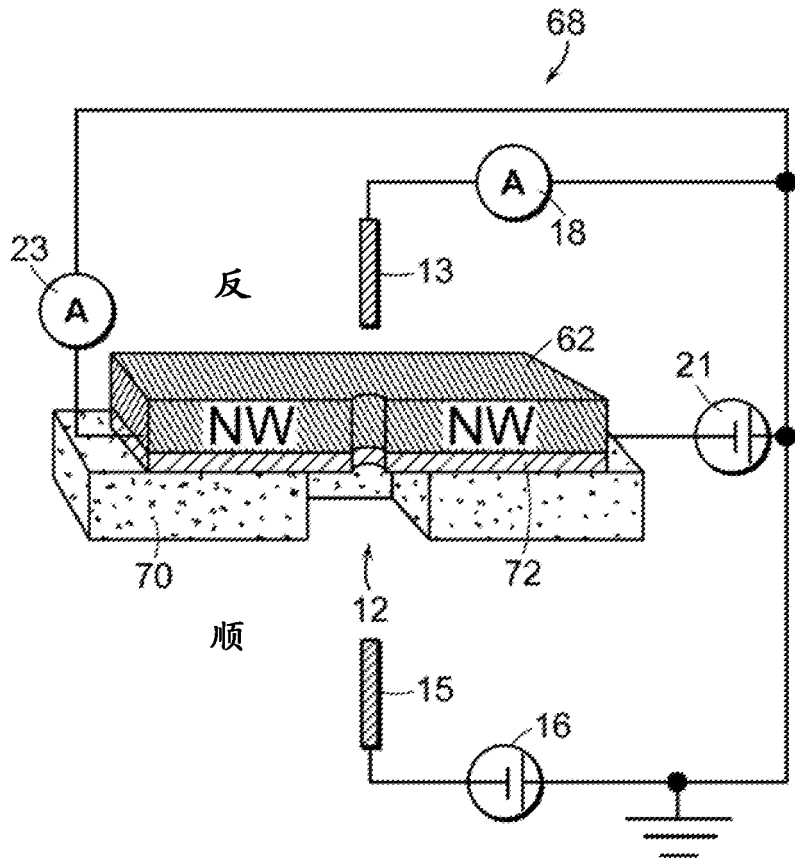


图 19A

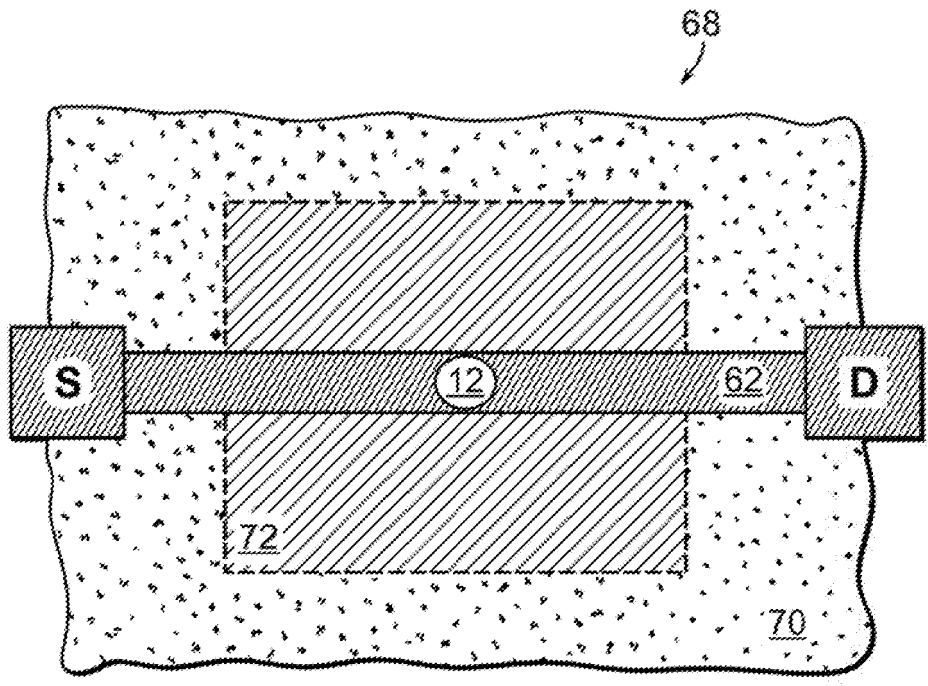


图 19B

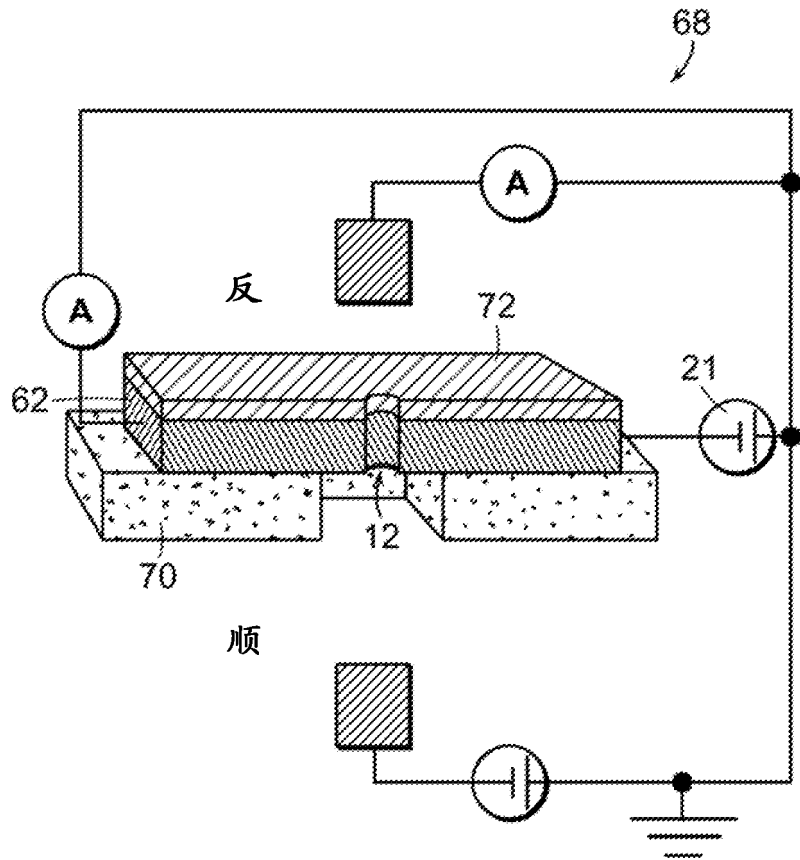


图 20A

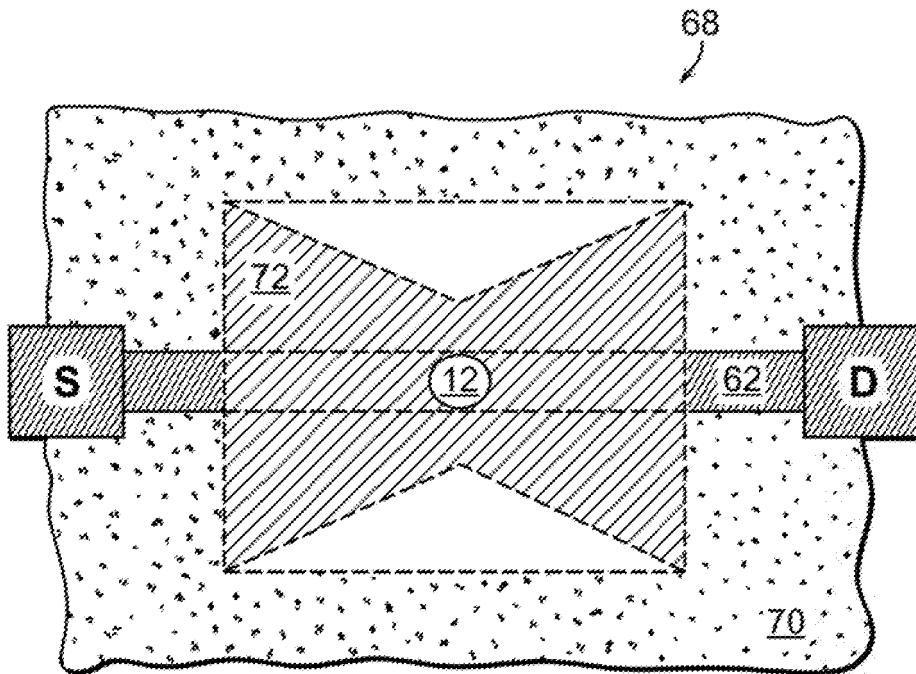


图 20B

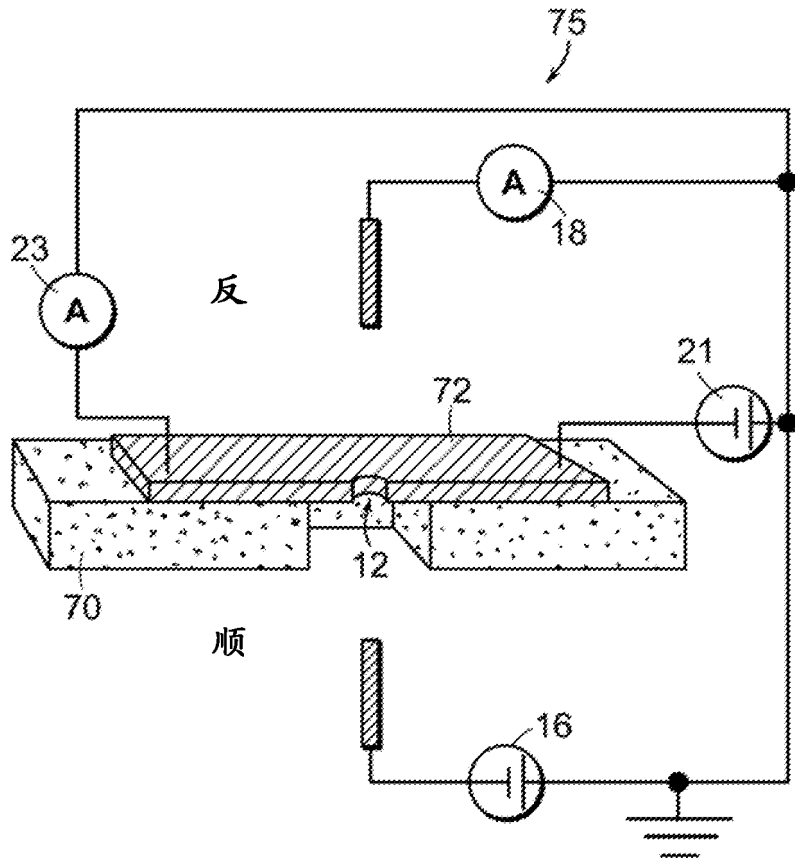


图 21A

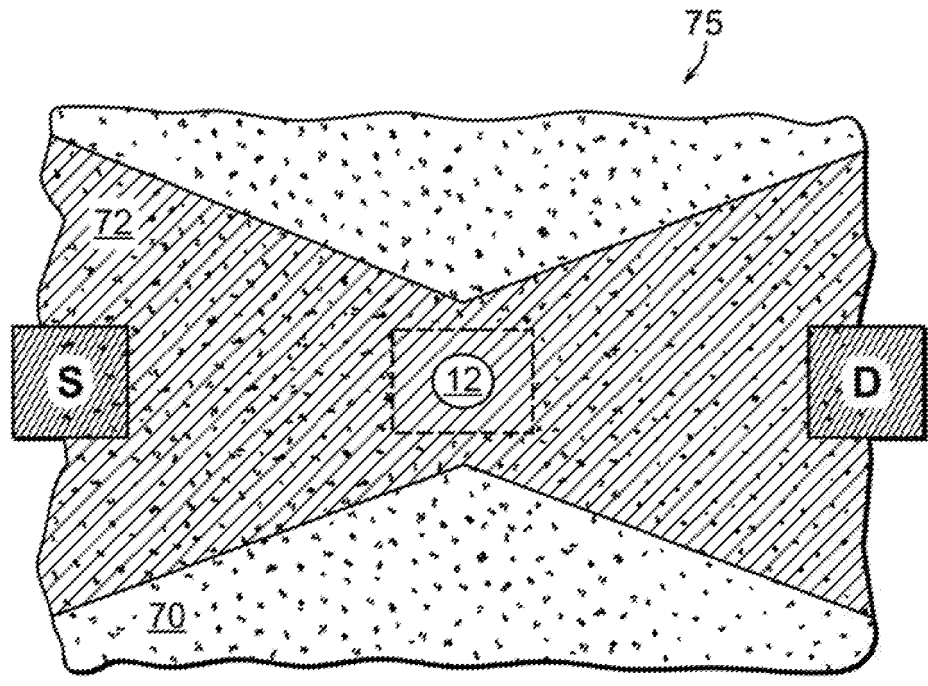


图 21B

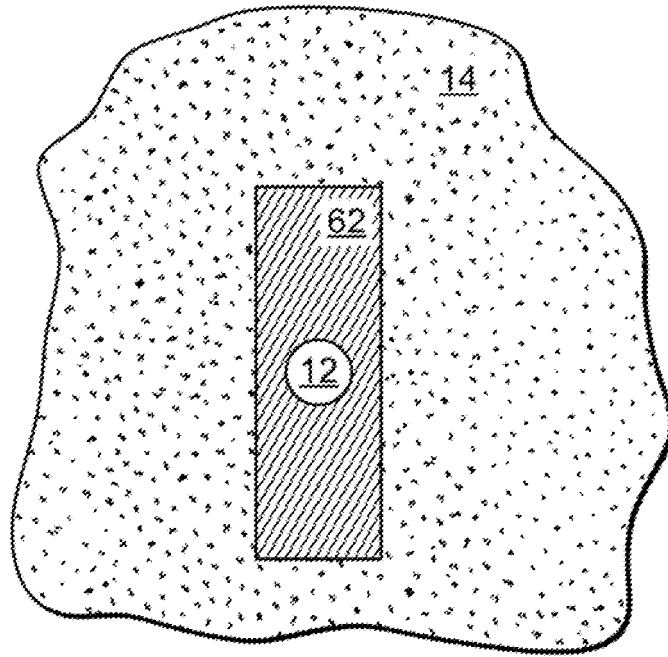


图 22A

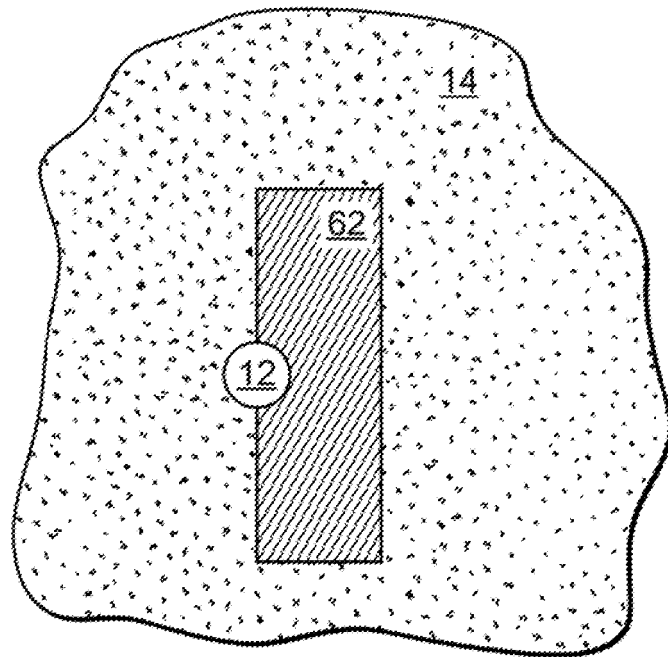


图 22B

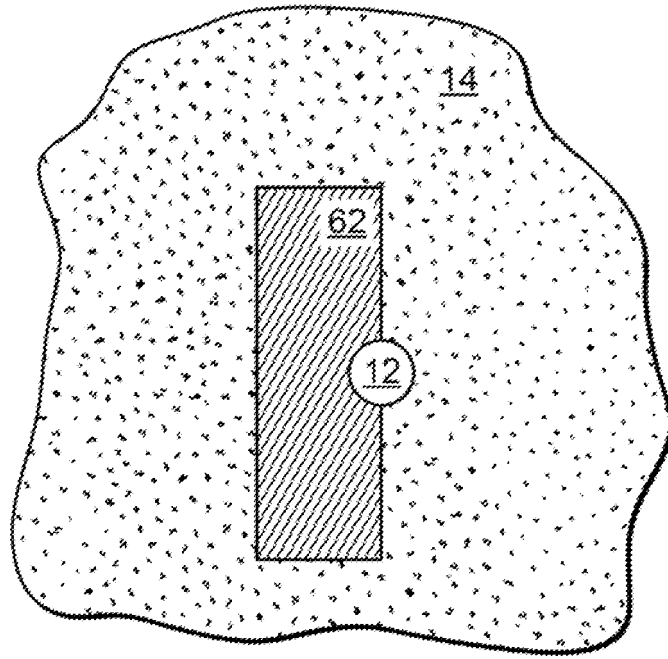


图 22C

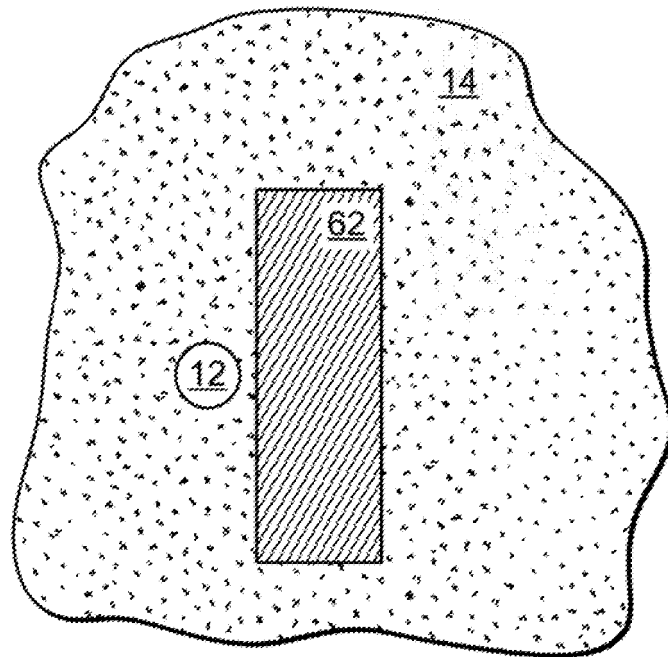


图 22D

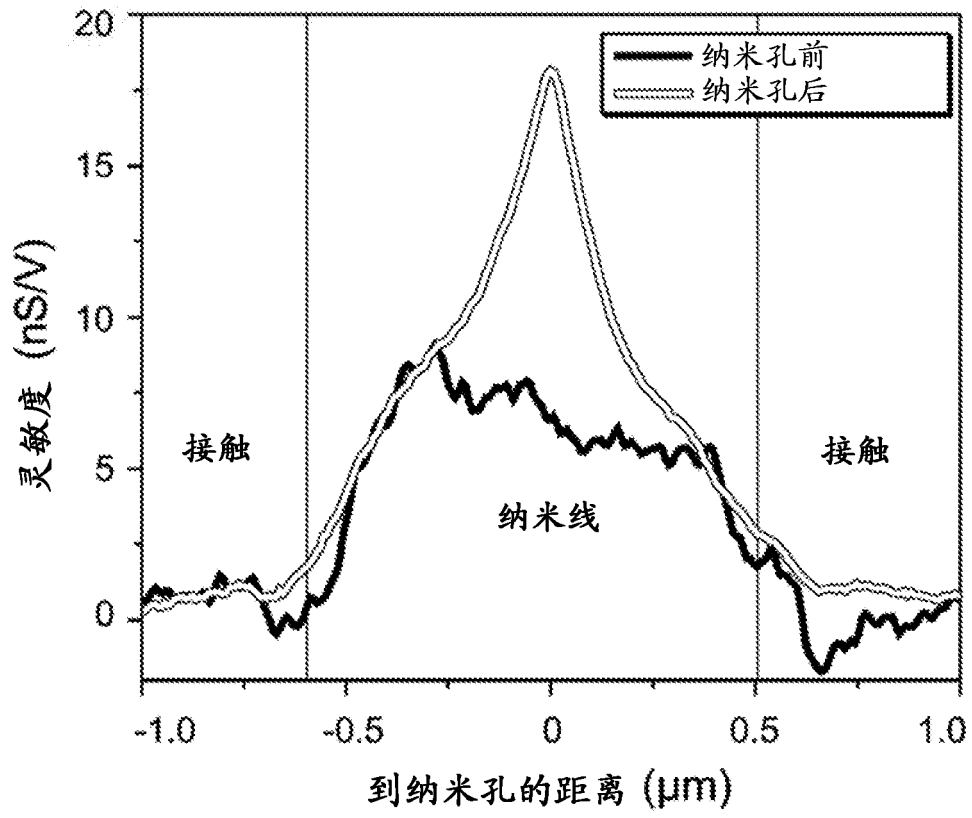


图 23

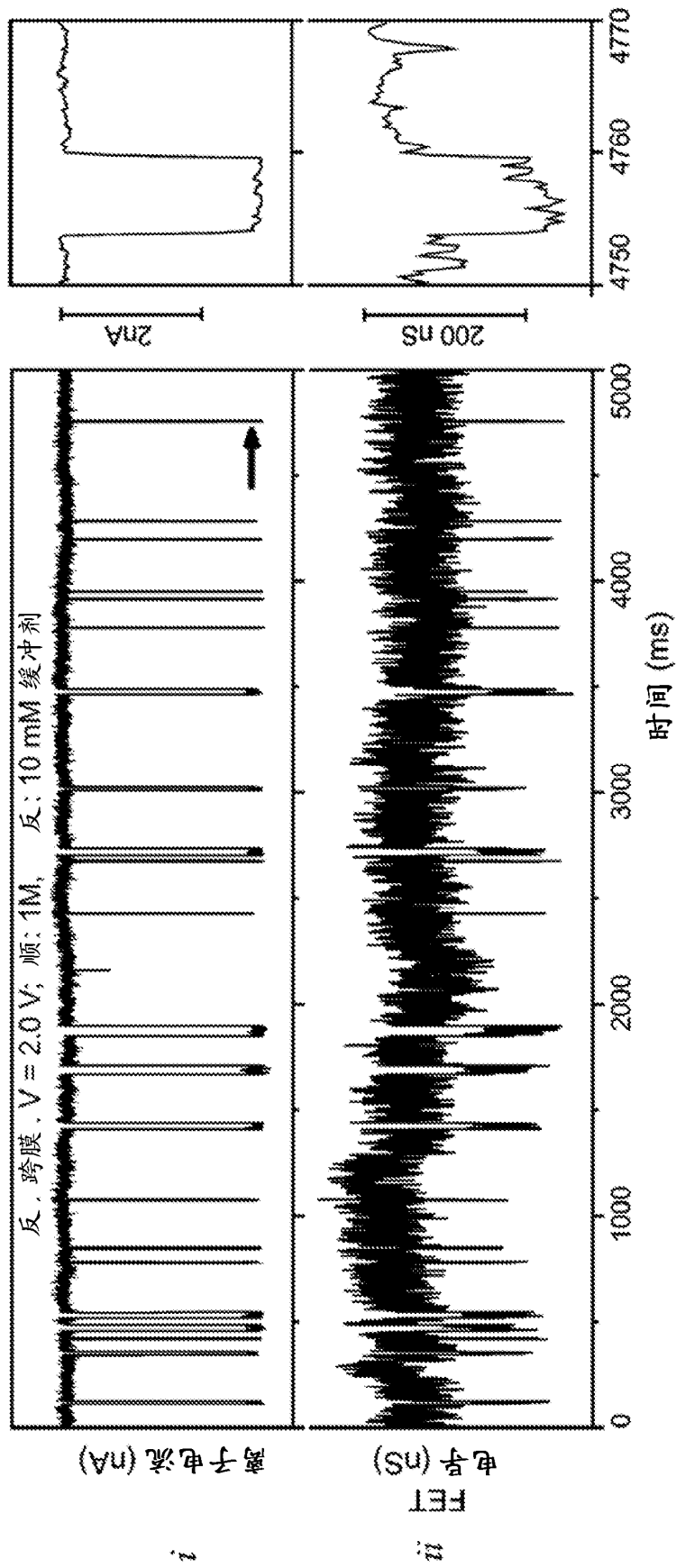


图 24A

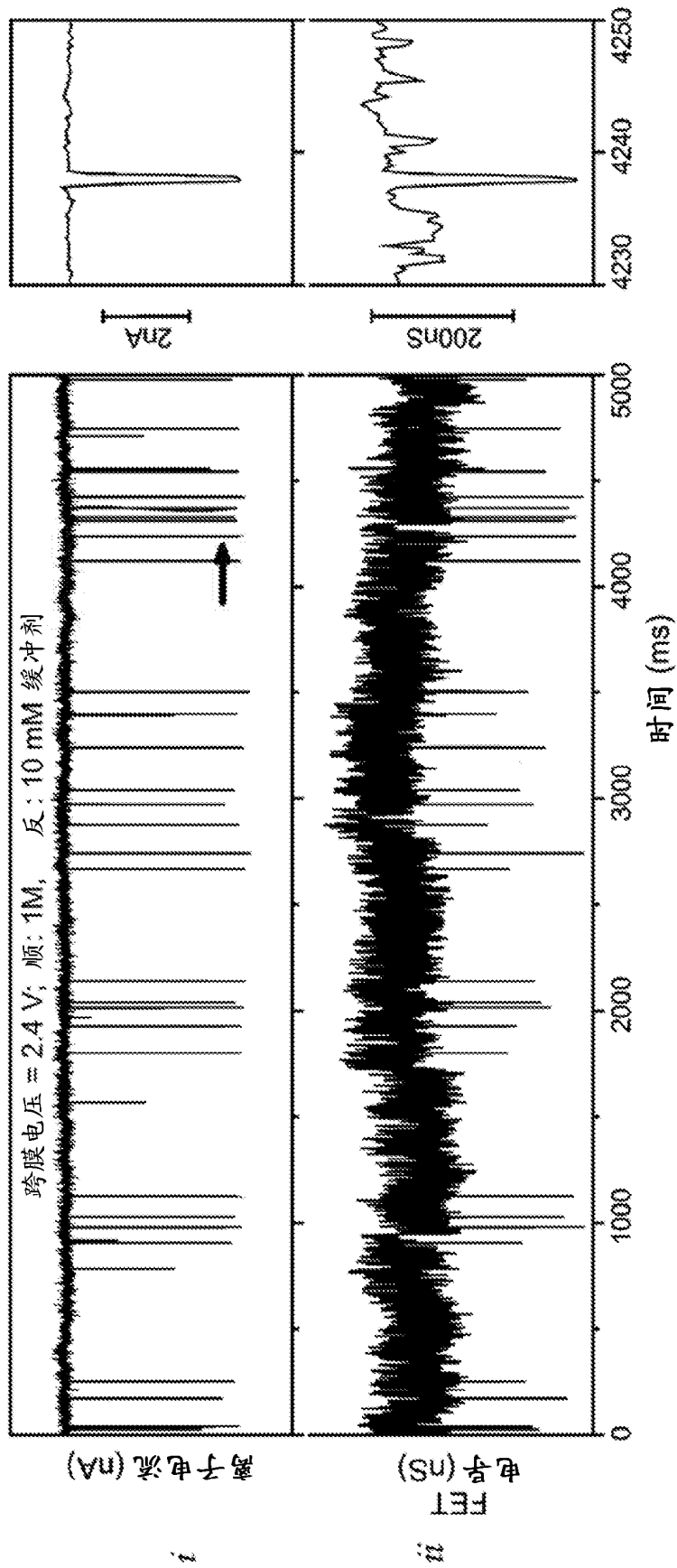


图 24B

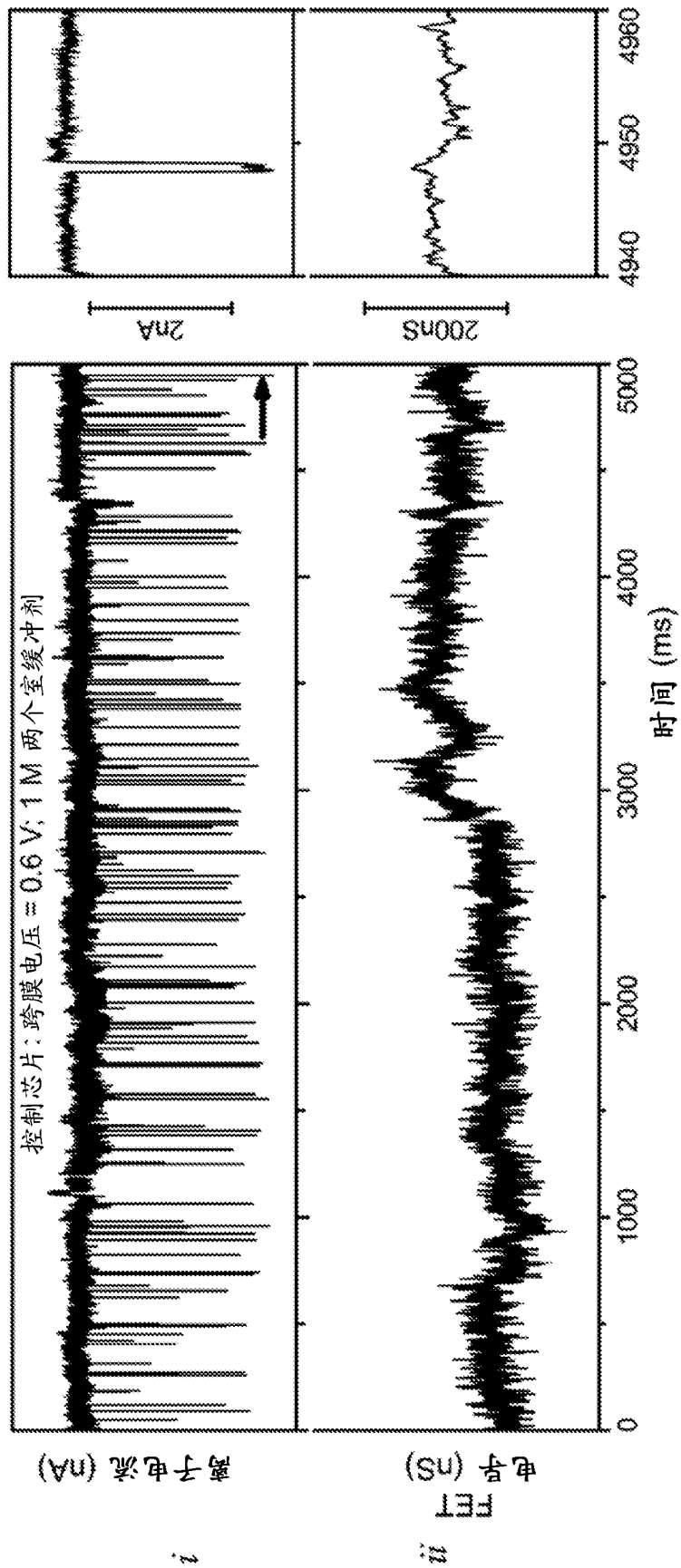


图 24C

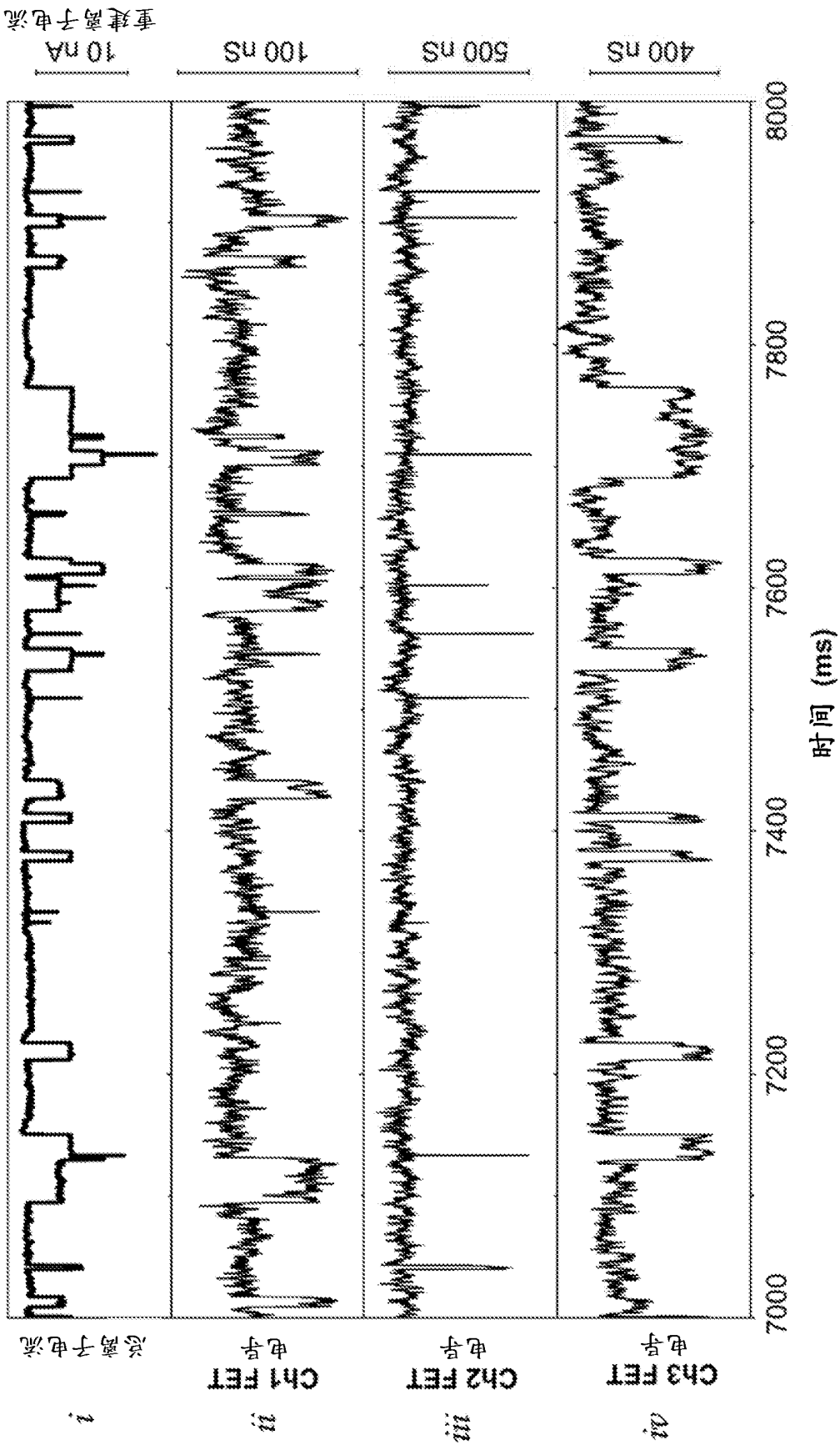


图 25