



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107690582 A

(43)申请公布日 2018.02.13

(21)申请号 201680032121.1

(22)申请日 2016.04.02

(30)优先权数据

62/142,872 2015.04.03 US

62/278,303 2016.01.13 US

62/279,488 2016.01.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/025787 2016.04.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/161402 EN 2016.10.06

(71)申请人 雅培制药有限公司

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 J.B.哈夫 M.A.海登

P.J.卡拉巴特索斯 A.S.沙帕尔斯

A.S.米尔霍夫 F.博丹 T.利里

S.R.霍尔茨-麦考马克 S.劳伦森

A.T.费希尔 R.哈克 S.赫什伯格

D.豪斯 L.乔 M.S.墨菲

M.R.波普 E.M.普里托-巴伦吉

Q.阮 P.索尼 S.特丁 L.亚内尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 周齐宏

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/487(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书18页 说明书126页 附图45页

(54)发明名称

用于样品分析的装置和方法

(57)摘要

公开了使用纳米孔进行分析物分析的方法、装置和系统。所述方法、装置和系统利用第一结合成员和第二结合成员,它们各自特异性地结合生物样品中的分析物。所述方法还包括检测和/或计数附接到所述第二结合成员的可切割标签,和将标签的存在和/或数目与所述分析物的存在和/或浓度相关联。所述方法的某些方面没有涉及标签,而是可以直接地检测/定量第二结合成员。通过使所述标签/第二结合成员穿过纳米孔转移,可以执行检测和/或计数。还提供了被编程以实现公开的方法的装置和系统。

1. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含与其附接的可切割标签;(c)除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员;(d)切割与第二结合成员附接的标签,所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

2. 权利要求1的方法,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,且测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i. 计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii. 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii. 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准。

3. 权利要求2的方法,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

4. 权利要求1-3中的任一项的方法,其中所述方法涉及单个分子计数。

5. 权利要求1-4中的任一项的方法,其中所述标签选自阴离子聚合物、阳离子聚合物、树枝状聚合物和纳米颗粒。

6. 权利要求1或5中的任一项的方法,其中所述标签是基本上球形的或半球形的。

7. 权利要求1-6中的任一项的方法,其中所述标签是基本上球形的且包含纳米颗粒。

8. 权利要求1-7中的任一项的方法,其中所述标签是基本上球形的或半球形的且包含树枝状聚合物。

9. 权利要求8的方法,其中所述树枝状聚合物是带正电荷的或带负电荷的。

10. 权利要求5或7的方法,其中所述纳米颗粒包含带正电荷的纳米颗粒。

11. 权利要求10的方法,其中所述纳米颗粒包含带负电荷的纳米颗粒。

12. 权利要求1-11中的任一项的方法,其中所述第一结合成员和所述第二结合成员是抗体或受体。

13. 权利要求1-12中的任一项的方法,其中所述第一结合成员是受体且所述第二结合成员是抗体,或其中所述第一结合成员是抗体且所述第二结合成员是受体。

14. 权利要求1-12中的任一项的方法,其中所述第一结合成员是第一抗体且所述第二结合成员是第二抗体。

15. 权利要求1-14中的任一项的方法,其中所述标签是带负电荷的,且所述转移包括跨所述层施加正电势由此穿过所述层转移所述标签。

16. 权利要求1-14中的任一项的方法,其中所述标签是带正电荷的,且所述转移包括跨所述层施加负电势由此穿过所述层转移所述标签。

17. 权利要求1-16中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)在以下装置中实施:微流体装置,基于微滴的微流体装置;数字微流体装置(DMF),基于表面声波的微流体装置(SAW),完全集成的DMF和纳米孔装置,或完全集成的SAW和纳米孔装置。

18. 权利要求17的方法,其中DMF元件和纳米孔元件在所述完全集成的DMF和纳米孔装置中可操作地偶联,或SAW元件和纳米孔元件在完全集成的SAW和纳米孔装置中可操作地偶联。

19. 权利要求17的方法,其中所述DMF装置或所述SAW装置通过基于卷对卷的印刷电子学方法制造。

20. 权利要求18的方法,其中所述DMF元件或所述SAW元件通过基于卷对卷的印刷电子学方法制造。

21. 权利要求17的方法,其中所述完全集成的DMF和纳米孔装置或所述完全集成的SAW和纳米孔装置包含微流体导管。

22. 权利要求21的方法,其中所述微流体导管将所述DMF元件偶联至所述纳米孔元件,且所述微流体导管包含通过被动力或主动力诱导的流体流。

23. 权利要求1-22中的任一项的方法,其中所述纳米孔是固态纳米孔或生物纳米孔。

24. 权利要求1-23中的任一项的方法,其中测量穿过所述层转移的标签的数目包括观察由所述标签与所述纳米孔的相互作用诱导的电流的变化。

25. 权利要求24的方法,其中当所述电流变化具有超过阈值水平的量级时,所述分析物存在于所述样品中。

26. 权利要求23的方法,其中所述方法还包括:将含有在步骤(d)中得到的标签的微滴运输至纳米孔装置,和横过存在于所述纳米孔装置中的纳米孔层放置所述微滴,使得所述微滴被所述纳米孔层分割且通过存在于所述纳米孔层中的纳米孔连接,其中所述标签存在于在所述纳米孔层的两个侧面上的微滴中。

27. 权利要求26的方法,其中所述方法包括:将存在于所述纳米孔层的第一侧面上的标签横过所述纳米孔转移至所述纳米孔层的第二侧面,由此将所述标签收集在纳米孔层的第二侧面上的分割微滴中。

28. 权利要求26的方法,所述方法还包括:将所述标签转移至所述纳米孔层的第一侧面,和确定存在于所述微滴中的标签的数目。

29. 权利要求1-28中的任一项的方法,其中所述标签包含可切割的接头。

30. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、第一特异性结合成员和第二特异性结合成员接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述第一特异性结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述第一特异性结合成员特异性地结合所述目标分析物,所述第二特异性结合成员包含可切割标签,且所述第二特异性结合成员特异性地结合所述目标分析物,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/目标分析物/第二特异性结合成员复合物;(b)除去未结合至所述固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物的第二特异性结合成员;(c)切割标签,所述标签附接到与所述固体支持物/第一特异性结合成员/目标分析物/第二特异性结合成员复合物中的第二特异性结合成员结合的经标记的分析物;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所

述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

31.一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含适体;(c)除去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体;(d)解离与所述分析物结合的适体(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(f)评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

32.权利要求31的方法,其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件,且测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i.计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii.测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii.测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准。

33.权利要求32的方法,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

34.权利要求31-33中的任一项的方法,其中所述方法涉及单个分子计数。

35.权利要求31-34中的任一项的方法,其中所述适体是DNA适体。

36.权利要求31-34中的任一项的方法,其中所述适体是RNA适体。

37.权利要求31-36中的任一项的方法,其中所述第一结合成员是抗体。

38.权利要求31-36中的任一项的方法,其中所述分析物是配体,且所述第一结合成员是受体。

39.权利要求31-38中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)在以下装置中实施:微流体装置,基于微滴的微流体装置,数字微流体装置(DMF),基于表面声波的微流体装置(SAW),完全集成的DMF和纳米孔装置,或完全集成的SAW和纳米孔装置。

40.权利要求39的方法,其中DMF元件和纳米孔元件在所述完全集成的DMF和纳米孔装置中可操作地偶联,或SAW元件和纳米孔元件在完全集成的SAW和纳米孔装置中可操作地偶联。

41.权利要求39的方法,其中所述DMF装置或所述SAW装置通过基于卷对卷的印刷电子学方法制造。

42.权利要求40的方法,其中所述DMF元件或所述SAW元件通过基于卷对卷的印刷电子学方法制造。

43.权利要求39的方法,其中所述完全集成的DMF和纳米孔装置或所述完全集成的SAW和纳米孔装置包含微流体导管。

44.权利要求43的方法,其中所述微流体导管将所述DMF元件偶联至所述纳米孔元件,

且所述微流体导管包含通过被动力或主动力诱导的流体流。

45. 权利要求31-44中的任一项的方法,其中所述纳米孔是固态纳米孔或生物纳米孔。

46. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;和设置在所述第一基底和第二基底之间的纳米孔层,其中所述电极阵列被构造成将所述微滴定位成横过所述纳米孔层,使得所述微滴被所述纳米孔层分割成第一部分和第二部分,其中所述电极阵列的至少两个电极定位成横过所述纳米孔层,其中所述两个电极形成阳极和阴极,并在液体微滴定位成横过所述纳米孔层时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

47. 权利要求46的装置,其中所述纳米孔层附接到所述第一基底和第二基底。

48. 权利要求46的装置,其中所述纳米孔层附接到所述第一基底或所述第二基底。

49. 权利要求46-48中的任一项的装置,其中所述电极是透明的。

50. 权利要求46-49中的任一项的装置,其中所述电极以网格图案设置。

51. 权利要求46-50中的任一项的装置,其中所述定位成横过所述纳米孔层的电极阵列的至少两个电极侧接所述纳米孔层且没有定位成横过所述纳米孔层。

52. 权利要求46-51中的任一项的装置,其中所述电极是互相交叉的。

53. 权利要求46-51中的任一项的装置,其中所述电极阵列被构造成由电源激活,其中所述电源以相继方式激活所述电极。

54. 权利要求53的装置,其中相继方式包括将一个或多个电极打开或关闭。

55. 权利要求52-54中的任一项的装置,其中电源对所述电极阵列的激活由控制所述电源的处理器所执行的一组指令控制。

56. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;和设置在所述第一基底和第二基底之间的纳米孔层,其中所述电极阵列被构造成将所述微滴定位成横过所述纳米孔层,使得所述纳米孔层将所述微滴分割成第一部分和第二部分,其中所述电极阵列的至少一个电极与定位成横过所述纳米孔层的微滴的第一部分发生接触,且所述第二基底中的电极定位成接触定位成横过所述纳米孔层的微滴的第二部分,其中所述两个电极形成阳极和阴极,并在液体微滴定位成横过所述纳米孔层时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

57. 权利要求56的装置,其中所述纳米孔层附接到所述第一基底。

58. 权利要求56或57中的任一项的装置,其中所述纳米孔层附接到所述第二基底。

59. 权利要求56-58中的任一项的装置,其中所述第一基底和/或第二基底是透明的。

60. 权利要求56-59中的任一项的装置,其中所述电极阵列是透明的。

61. 一种试剂盒,其包含权利要求46-60中的任一项的装置,或用于用在权利要求1-45中的任一项的方法中。

62. 权利要求61的试剂盒,所述试剂盒还包含另外的试剂,其中至少一种试剂包含通过穿过所述装置的纳米孔层的转移可以检测的标签。

63. 使用权利要求46-60中的任一项的装置的方法,或条款1-45中的任一项的方法,用于测量或检测存在于生物样品中的分析物或用于诊断患者或筛查血液供给。

64. 权利要求1-45中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)使用权利要求46-60中的任一项的装置实施。

65. 权利要求46-60中的任一装置的用途,或权利要求1-45中的任一方法的方法的用途,其用在诊断患者或筛查血液供给的方法中或用于测量或检测存在于生物样品中的分析物。

66. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述经标记的分析物用可切割标签标记;(c)除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;(d)切割标签,所述标签附接到与所述结合成员结合的经标记的分析物;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

67. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中结合成员被固定化在固体支持物上,且其中结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述经标记的分析物包含适体;(c)除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;(d)解离结合至所述经标记的分析物的适体,并穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e)评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

68. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员用可切割标签标记;(b)使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c)除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d)切割标签,所述标签附接到与所述固定化的分析物结合的结合成员;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

69. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员包含适体;(b)使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c)除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d)解离适体,所述适体结合至与所述固定化的分析物结合的结合成员,和穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e)评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

70. 权利要求66或68的方法,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,且测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:

- i. 计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;
- ii. 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或者

iii. 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联，其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准。

71. 权利要求67或69的方法，其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件，且测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量：

- i. 计数在设定的时间段内转移事件的数目，并将所述转移事件的数目与对照关联；
- ii. 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联；或者
- iii. 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联，其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准。

72. 权利要求70或71的方法，其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线；其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线；且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

73. 权利要求66-72中的任一项的方法，其中所述方法涉及单个分子计数。

74. 权利要求66、68、70、72或73中的任一项的方法，其中至少步骤(a)-(d)使用权利要求46-60中的任一项的装置实施。

75. 权利要求67、69、71、72或73中的任一项的方法，其中至少步骤(a)-(d)使用权利要求46-60中的任一项的装置实施。

76. 权利要求66、68、70、72、73或74中的任一项的方法，其中所述标签选自阴离子聚合物、阳离子聚合物、树枝状聚合物和纳米颗粒。

77. 权利要求66、68、70、72、73或74中的任一项的方法，其中所述标签是基本上球形的或半球形的。

78. 权利要求66、68、70、72、73或74中的任一项的方法，其中所述标签是基本上球形的且包含纳米颗粒。

79. 权利要求66、68、70、72、73或74中的任一项的方法，其中所述标签是基本上球形的或半球形的且包含树枝状聚合物。

80. 权利要求79的方法，其中所述树枝状聚合物是带正电荷的或带负电荷的。

81. 权利要求79的方法，其中所述纳米颗粒包含带正电荷的纳米颗粒。

82. 权利要求76或78的方法，其中所述纳米颗粒包含带负电荷的纳米颗粒。

83. 权利要求66、68、70、72、73、74或76-82中的任一项的方法，其中所述结合成员是抗体或受体。

84. 权利要求66、68、70、72、73、74或76-83中的任一项的方法，其中所述标签是带负电荷的，且所述转移包括跨所述层施加正电势由此使所述标签横过所述层转移。

85. 权利要求66、68、70、72、73、74或76-84中的任一项的方法，其中所述标签是带正电荷的，且所述转移包括跨所述层施加负电势由此使所述标签横过所述层转移。

86. 权利要求66、68、70、72、73、74或76-85中的任一项的方法，其中测量穿过所述层转移的标签的数目包括观察所述纳米孔上的标签的电流阻断效应。

87. 权利要求86的方法，其中当所述电流阻断效应高于阈值水平时，所述分析物存在于所述样品中。

88. 权利要求67、69、71、72、73或75中的任一项的方法,其中所述适体是DNA适体。
89. 权利要求67、69、71、72、73或75中的任一项的方法,其中所述适体是RNA适体。
90. 权利要求67、69、71、72、73、75、88或89中的任一项的方法,其中所述结合成员是抗体。
91. 权利要求67、69、71、72、73、75、88或89中的任一项的方法,其中所述分析物是配体且所述结合成员是受体。
92. 权利要求67、69、71、72、73、75或88-91中的任一项的方法,其中所述方法还包括:将含有所述标签的微滴运输至纳米孔装置,和横过存在于所述纳米孔装置中的纳米孔层放置所述微滴,使得所述微滴被所述纳米孔层分割且通过存在于所述纳米孔层中的纳米孔连接,其中所述标签存在于在所述纳米孔层的两个侧面上的微滴中。
93. 权利要求92的方法,其中所述方法包括:将存在于所述纳米孔层的第一侧面上的标签横过所述纳米孔转移至所述纳米孔层的第二侧面,由此将所述标签收集在纳米孔层的第二侧面上的分割微滴中。
94. 权利要求92的方法,所述方法还包括:将所述标签转移至所述纳米孔层的第一侧面,和确定存在于所述微滴中的标签的数目。
95. 权利要求67、69、71、72、73、75或88-94中的任一项的方法,其中所述方法还包括:将含有所述适体的微滴运输至纳米孔装置,和横过存在于所述纳米孔装置中的纳米孔层放置所述微滴,使得所述微滴被所述纳米孔层分割且通过存在于所述纳米孔层中的纳米孔连接,其中所述适体存在于所述纳米孔层的两个侧面上的微滴中。
96. 权利要求95的方法,其中所述方法包括:将存在于所述纳米孔层的第一侧面上的适体横过所述纳米孔转移至所述纳米孔层的第二侧面,由此将所述适体收集在所述纳米孔层的第二侧面上的分割微滴中。
97. 权利要求95的方法,所述方法还包括:将所述适体转移至所述纳米孔层的第一侧面,和确定存在于所述微滴中的适体的数目。
98. 权利要求66-97中的任一项的方法,其中所述纳米孔是固态纳米孔或生物纳米孔。
99. 权利要求1-45或63-98中的任一项的方法,其中所述第二结合成员还包含间隔物。
100. 权利要求99的方法,其中所述间隔物包含硝基苄基、二硫代乙基氨基、6碳间隔物、12碳间隔物或3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐。
101. 权利要求100的方法,其中所述间隔物包含硝基苄基,且所述标签是DNA分子。
102. 权利要求100的方法,其中所述间隔物是二硫代乙基氨基,且所述标签是羧基化的纳米颗粒。
103. 权利要求100的方法,其中所述间隔物是3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐,且所述标签是寡核苷酸。
104. 权利要求103的方法,其中所述间隔物包含6碳间隔物或12碳间隔物,且所述标签是生物素。
105. 权利要求104的方法,其中所述第二结合成员包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO: 1-11中的任一个所示的核苷酸序列。
106. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含微流体模块和纳米孔模块;所述微流

体模块包含电极阵列,其中所述电极阵列将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的第一转移位置,其中所述第一转移位置是在所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口处;所述纳米孔模块包含:第一毛细管通道;和第二毛细管通道;其中至少所述第一毛细管通道延伸至所述接口且邻近所述第一转移位置,并且定位成接收定位在所述第一转移位置处的流体微滴;其中所述第一毛细管通道与所述第二毛细管通道相交,其中纳米孔层定位在所述第一毛细管通道和第二毛细管通道之间所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道发生相交的位置。

107. 权利要求106的装置,其中所述电极阵列将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的第二转移位置,其中所述第二转移位置是在所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口处,其中所述第二毛细管通道延伸至所述接口且邻近所述第二转移位置,并且定位成接收定位在所述第二转移位置处的流体微滴。

108. 权利要求106的装置,其中所述第二毛细管通道在所述第二毛细管通道的一个或两个末端上的排出口或蓄池之间延伸。

109. 权利要求108的装置,其中所述第二毛细管通道连接至在一个末端处的第一蓄池和在另一个末端处的第二蓄池。

110. 权利要求109的装置,其中所述第一蓄池和/或所述第二蓄池包含流体,所述流体要定位成在所述第二毛细管通道内在所述相交处,所述流体促进所述纳米孔层的运行以驱动电流穿过所述纳米孔层的纳米孔。

111. 权利要求109的装置,其中所述第一毛细管通道和/或所述第二毛细管通道在横过所述毛细管通道的长度的横截面宽度上变化,使得所述宽度与在所述相交处的任一侧上的宽度相比在所述相交处减小。

112. 权利要求106的装置,其中所述第一毛细管通道包含第一对电极,且所述第二毛细管通道包含第二对电极,其中所述第一对电极定位在所述第一毛细管通道中且侧接所述纳米孔层中的纳米孔,且其中第二对电极定位在所述第二毛细管通道且侧接所述纳米孔层中的纳米孔。

113. 权利要求107-112中的任一项的装置,其中所述微滴是包含要通过运输穿过所述纳米孔层中的纳米孔来计数的分子的微滴。

114. 权利要求107的装置,其中所述流体微滴具有不同的组成且是第一微滴和第二微滴,所述第一微滴包含要通过穿过所述纳米孔横过所述纳米孔层运输来计数的分子,且所述第二微滴包含缺乏所述分子的导电流体,其中所述导电流体促进所述分子经由纳米孔横过所述纳米孔层的运输。

115. 权利要求106-114中的任一项的装置,其中所述第一毛细管通道包含定位在所述纳米孔层的近端的第一电极,且所述第二毛细管通道包含定位在所述纳米孔层的近端的第二电极,其中所述第一电极和第二电极中的每一个暴露在所述毛细管通道中,使得它们与存在于所述毛细管通道中的流体发生接触,且其中当液体定位成横过所述第一毛细管通道和第二毛细管通道中的纳米孔层时,所述第一电极和第二电极运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

116. 权利要求106-115中的任一项的装置,其中所述第一转移位置和所述第一毛细管通道是在基本上同一个平面上,且其中所述流体微滴与所述第一毛细管通道的开口对齐。

117. 权利要求106-115中的任一项的装置,其中所述第一转移位置是在比所述第一毛细管通道更高的平面处,且其中所述装置被构造成具有垂直端口,所述垂直端口用于将所述流体微滴向下转移至所述第一毛细管通道的开口。

118. 权利要求117的装置,其中所述第一基底的第一表面包含在其上面设置所述电极阵列的第一区域和在其中形成所述第一微通道的第二区域,其中所述电极阵列是在这样的平面上:所述平面高于在其上面形成所述第一微通道的平面。

119. 权利要求117的装置,其中所述第二基底包含在位于所述接口的侧边缘处的凹槽,其中所述凹槽在所述第一毛细管通道上面对齐并提供垂直端口,所述垂直端口用于将位于所述转移电极处的微滴运输至所述第一毛细管通道的开口。

120. 权利要求106-119中的任一项的装置,所述装置还包含与所述电极阵列间隔的单个电极,其中所述单个电极在所述第一转移位置处的所述电极阵列的至少一部分上面延伸,且与在所述第一转移位置处的所述电极阵列的至少一部分呈双平面构型。

121. 权利要求107-119中的任一项的装置,所述装置还包含与所述电极阵列间隔的单个电极。

122. 权利要求106-119中的任一项的装置,所述装置还包含与所述电极阵列间隔的单个电极,其中所述单个电极没有在所述第一转移位置上面延伸且没有与所述电极阵列呈双平面构型,其中通过使用共面电极使所述流体微滴移动至所述第一转移位置。

123. 权利要求106-119中的任一项的装置,所述装置还包含与所述电极阵列间隔的单个电极,其中所述单个电极没有在所述第一转移位置上面延伸且没有与所述电极阵列呈双平面构型,其中通过使用共面电极使所述流体微滴移动至所述转移位置。

124. 使用权利要求106-123中的任一项的装置的方法,或权利要求66-105中的任一项的方法,用于测量或检测存在于生物样品中的分析物或用于诊断患者或筛查血液供给。

125. 权利要求1-45或66-105中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)使用权利要求106-123中的任一项的装置实施。

126. 权利要求106-123中的任一项的装置的用途,或权利要求1-45中的任一项的方法的用途,在诊断患者或筛查血液供给的方法中或用于测量或检测存在于生物样品中的分析物。

127. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含与其附接的可切割标签;(c)除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员;(d)切割与第二结合成员附接的标签,所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时

间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

128. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含适体;(c)除去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体;(d)解离与所述分析物结合的适体和(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(f)评估穿过所述层转移的适体,其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

129. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述经标记的分析物用可切割标签标记;(c)除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;(d)切割标签,所述标签附接到与所述结合成员结合的经标记的分析物;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

130. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中结合成员被固定化在固体支持物上,且其中结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述经标记的分析物包含适体;(c)除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;(d)解离结合至所述经标记的分析物的适体,并穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e)评估穿过所述层转移的适体,其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在

于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

131.一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员用可切割标签标记;(b)使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c)除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d)切割标签,所述标签附接到与所述固定化的分析物结合的结合成员;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

132.一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员包含适体;(b)使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c)除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d)解离适体,所述适体结合至与所述固定化的分析物结合的结合成员,和穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e)评估穿过所述层转移的适体,其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

133.一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员被固定化在固体支持物上,所述结合成员包含与其附接的可切割标签,且所述结合成员特异性地结合所述分析物;(b)除去未结合至所述

分析物的结合成员；(c) 切割标签，所述标签附接到与所述分析物结合的结合成员；(d) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签；和(e) 评估穿过所述层转移的标签，其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件，其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量：i) 计数在设定的时间段内转移事件的数目，并将所述转移事件的数目与对照关联；ii) 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联；或iii) 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联，其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参照。

134. 权利要求133的方法，其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i) 中的标准曲线；其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii) 中的标准曲线；且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii) 中的标准曲线。

135. 一种集成的数字微流体纳米孔实现装置，其包含：微流体模块和纳米孔实现模块；所述微流体模块包含与单个电极间隔的电极阵列，所述单个电极的大小设置成与所述电极阵列的至少一部分重叠，其中所述电极阵列和所述单个电极将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的转移电极，其中所述转移电极定位在所述微流体模块和所述纳米孔实现模块之间的接口处；所述纳米孔实现模块包含：定位在第一基底的第一表面上的第一微通道；定位在第二基底的第一表面上的第二微通道；其中所述第一基底的第一表面与所述第二基底的第一表面发生接触，由此封闭所述第一微通道和所述第二微通道以分别提供第一毛细管通道和第二毛细管通道，其中至少所述第一毛细管通道延伸至所述微流体模块和所述纳米孔实现模块之间的接口且邻近所述转移电极，并且定位成接收定位在所述转移电极上的流体微滴；其中所述第一毛细管通道与所述第二毛细管通道相交，其中一个层定位在所述第一基底和第二基底之间所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道发生相交的位置，其中所述层缺乏纳米孔且分离存在于所述第一毛细管通道和第二毛细管通道中的离子液体，其中所述第一毛细管通道和第二毛细管通道与用于驱动从所述第一毛细管通道至所述第二毛细管通道(或反之亦然)的电压的电极发生电连接以在所述层中在所述第一毛细管通道和第二毛细管通道的相交处建立纳米孔。

136. 权利要求135的装置，其中所述离子液体是水溶液。

137. 权利要求136的装置，其中所述水溶液是盐溶液。

138. 权利要求135-137中的任一项的装置，其中所述离子液体包含目标分析物，其中所述装置被构造成检测所述分析物在所述离子液体中的存在或不存在。

139. 一种用于在集成的数字微流体纳米孔实现装置中产生纳米孔的方法，所述方法包括：提供权利要求135-138中的任一项的集成的数字微流体纳米孔实现装置；在所述第一毛细管通道和第二毛细管通道中施加电压以驱动电流穿过所述层；测量跨所述层的电导；在检测到指示纳米孔在所述层中产生的电导后，终止电压的施加。

140. 一种集成的数字微流体纳米孔装置，其包含：第一基底，其包含电极阵列；与所述第一基底间隔的第二基底；在所述第一基底或第二基底中的开口，所述开口与包含纳米孔的纳米孔层流体连通；和一对电极，所述电极被构造成穿过所述纳米孔施加电场，其中所述电极阵列被构造成将流体的至少一个微滴运输至所述开口。

141. 权利要求140的装置，其中所述开口是毛细管通道。

142. 权利要求141的装置,其中所述毛细管通道具有在所述第一基底或第二基底的第一侧面上的开口,所述开口宽于在所述第一基底或第二基底的第二侧面上的开口。

143. 权利要求142的装置,其中所述检测电极对包含是单个电极的第一检测电极。

144. 权利要求142或143的装置,其中所述检测电极对包含设置在所述第二侧面上的第二检测电极。

145. 一对集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:

根据权利要求142的第一个集成的数字微流体纳米孔装置,其中所述单个电极是第一单个电极,且所述毛细管通道是第一毛细管通道;和第二个集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第三基底,其包含第五侧面和与所述第五侧面相对的第六侧面,其中所述第五侧面包含电极阵列;与所述第三基底间隔的第四基底,其中所述第四基底包含面向所述第三基底的第五侧面的第七侧面和与所述第七侧面相对的第八侧面,其中所述第七侧面包含第二单个电极,且其中所述纳米孔层设置在所述第八侧面上,其中所述第四基底包含从所述第四基底的第七侧面延伸至第八侧面的第二毛细管通道,其中所述纳米孔层定位在所述毛细管通道的开口上面,其中所述纳米孔层介于所述第二基底和所述第四基底之间,使得所述纳米孔提供在所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道之间的电渗导管,其中所述检测电极对包含第二检测电极,其为所述第二单个电极。

146. 一种集成的数字微流体纳米孔实现装置,其包含:第一基底,其包含第一侧面和与所述第一侧面相对的第二侧面,其中所述第一侧面包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底,其中所述第二基底包含面向所述第一基底的第一侧面的第三侧面和与所述第三侧面相对的第四侧面;纳米孔实现层,其缺乏纳米孔且设置在所述装置的外侧面上,其中所述外侧面选自所述第二侧面或所述第四侧面,其中包含所述外侧面的第一基底或第二基底之一包含毛细管通道,所述毛细管通道从所述第一基底的第一侧面延伸至第二侧面或者从所述第二基底的第三侧面延伸至第四侧面,其中所述纳米孔实现层定位在所述毛细管通道的开口上面;和一对电极,所述电极被构造成跨所述纳米孔实现层施加电场,其中所述电极阵列被构造成将流体的至少一个微滴运输至所述毛细管通道。

147. 一种用于在集成的数字微流体纳米孔实现装置中产生纳米孔的方法,所述方法包括:提供权利要求143的集成的数字微流体纳米孔实现装置;将所述纳米孔实现层的两个侧面浸入离子液体中,使得在所述层的每个侧面上的离子液体与所述检测电极对的任一个发生电接触;在所述检测电极对之间施加电压以驱动电流穿过所述层;测量跨所述层的电导;在检测到指示纳米孔在所述层中产生的电导后,终止电压的施加。

148. 权利要求147的方法,其中所述离子液体是盐溶液。

149. 权利要求147或148的方法,其中所述离子液体包含目标分析物,其中所述装置被构造成检测所述分析物在所述离子液体中的存在或不存在。

150. 权利要求139或147-149中的任一项的方法,所述方法还包括调节产生的纳米孔。

151. 权利要求150的方法,其中所述调节包括:跨所述纳米孔膜交替地施加具有第一极性的第一电压和具有与所述第一极性相反的第二极性的第二电压,其中所述第一电压和第二电压各自施加至少一次;和测量与所述纳米孔的大小有关的电渗性质。

152. 权利要求150或151的方法,所述方法还包括在所述调节之前测量与所述纳米孔的大小有关的电渗性质。

153. 一种组合物,其包含结合成员、标签和间隔物。

154. 权利要求153的组合物,其中所述间隔物包含硝基苄基、二硫代乙基氨基、6碳间隔物、12碳间隔物、或3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎗-10-基)丙烷-1-磺酸盐。

155. 权利要求154的组合物,其中所述间隔物包含硝基苄基,且所述标签是DNA分子。

156. 权利要求154的组合物,其中所述间隔物是二硫代乙基氨基,且所述标签是羧基化的纳米颗粒。

157. 权利要求154的组合物,其中所述间隔物是3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎗-10-基)丙烷-1-磺酸盐,且所述标签是寡核苷酸。

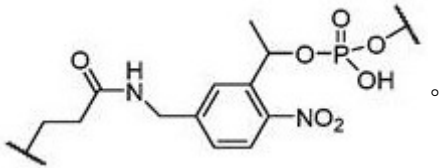
158. 权利要求154的组合物,其中所述间隔物包含6碳间隔物或12碳间隔物,且所述标签是生物素。

159. 权利要求158的组合物,其中所述第二结合成员包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO: 1-11中的任一个所示的核苷酸序列。

160. 权利要求153-159中的任一项的组合物,其中所述标签包含可切割的接头。

161. 权利要求160的组合物,其中所述可切割的接头选自光可切割的接头、化学可切割的接头、热可切割的接头、热敏感的可切割的接头和酶可切割的接头。

162. 权利要求161的组合物,其中所述可切割的接头是光可切割的接头,其中所述光可切割的接头包含源自以下的光可切割的部分



163. 权利要求161的组合物,其中所述可切割的接头是热可切割的接头且使用局部温度升高来切割。

164. 权利要求163的组合物,其中所述局部温度升高光热地或通过微波辐射产生。

165. 权利要求164的组合物,其中将来自光的能量转移至吸收靶标。

166. 权利要求165的组合物,其中所述吸收靶标包含染料、颜料或水。

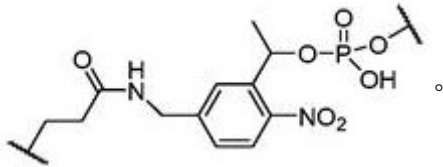
167. 权利要求163-166中的任一项的组合物,其中所述可切割的接头包含双链DNA。

168. 权利要求161的组合物,其中所述可切割的接头是化学可切割的接头和切割由巯基介导。

169. 权利要求29、66、68、70、72-86、92-94、98-105、127、129、131、133和134中的任一项的方法,其中所述标签包含可切割的接头。

170. 权利要求169的方法,其中所述可切割的接头选自光可切割的接头、化学可切割的接头、热可切割的接头、热敏感的可切割的接头和酶可切割的接头。

171. 权利要求170的方法,其中所述可切割的接头是光可切割的接头,且所述光可切割的接头包含源自以下的光可切割的部分



172. 权利要求170的方法,其中所述可切割的接头是热可切割的接头且使用局部温度升高来切割。

173. 权利要求172的方法,其中所述局部温度升高光热地或通过微波辐射产生。

174. 权利要求173的方法,其中将来自光的能量转移至吸收靶标。

175. 权利要求174的方法,其中所述吸收靶标包含染料、颜料或水。

176. 权利要求172-175中的任一项的方法,其中所述可切割的接头包含双链DNA。

177. 权利要求30和170的方法,其中所述可切割的接头是化学可切割的接头且由巯基切割。

178. 权利要求2-30、31-45、64、70-105、125、127-134和169-177中的任一项的方法,其中一个或多个转移事件对应于结合成员与分析物的结合事件。

179. 权利要求178的方法,其中一个转移事件对应于结合成员与分析物的结合事件。

180. 权利要求178的方法,其中两个或更多个转移事件对应于结合成员与分析物的结合事件。

181. 权利要求180的方法,其中每个结合成员掺入两种或更多种标签,且两个或更多个转移事件代表所述结合成员与所述分析物的结合。

182. 权利要求1-45、63-105、124、125、127-134和169-181中的任一项的方法,其中至少两个或更多个纳米孔是在所述层中。

183. 权利要求182的方法,其中所述至少两个或更多个纳米孔并联或串联存在。

184. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;和纳米孔层,其具有设置在所述第一基底和第二基底之间的第一表面和第二表面,其中所述电极阵列被构造成将第一微滴定位在所述纳米孔层的第一表面处,其中所述电极阵列的至少两个电极定位成横过所述纳米孔层,其中所述两个电极形成阳极和阴极,并在液体微滴是在所述纳米孔层的第一表面处时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

185. 权利要求173的电极阵列,其进一步被构造成将第二微滴定位在所述纳米孔层的第二表面。

186. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含微流体模块和纳米孔模块;所述微流体模块包含电极阵列,其中所述电极阵列将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的转移位置,其中所述转移位置是在所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口处;所述纳米孔模块包含:从所述转移位置延伸至纳米孔层的第一毛细管通道。

187. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;在其中具有一个或多个纳米孔的第一纳米孔层;在其中具有一个或多个纳米孔的第二纳米孔层;和至少两个电极,其用于建立电场以驱动标签穿过所述第一纳米孔层和第二纳米孔层中的纳米孔。

188. 权利要求30的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。

189. 权利要求188的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌素。

190. 权利要求188的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。

191. 权利要求30和188-190中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述第一结合成员和第二结合成员依次或同时加入所述样品中。

192. 权利要求1-45、63-105、124、125、127-134、169-181、183和188-191中的任一项的方法,其中所述孔与所述标签的大小比率是或小于1.0。

193. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和用可切割标签标记的经标记的分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述结合成员特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/结合成员/目标分析物复合物或固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物;(b)除去未结合至所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员的经标记的分析物;(c)切割标签,所述标签附接到与所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员结合的经标记的分析物;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

194. 权利要求193的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。

195. 权利要求194的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌素。

196. 权利要求194的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。

197. 权利要求193-196中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述结合成员和所述经标记的分析物依次或同时加入所述样品中。

198. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和外源分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述外源分析物包含所述固定化试剂的配体且结合所述固体支持物从而形成固体支持物/固定化的分析物复合物,且所述结合成员包含可切割标签且特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/目标分析物/结合成员复合物或固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物;(b)除去未结合在所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物或所述固体支持物/目标分析物/结合成员复合物中的结合成员;(c)切割标签,所述标签附接到所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物中的结合成员;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

199. 权利要求199. 权利要求198的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。

200. 权利要求199的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌

素。

201. 权利要求199的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。

202. 权利要求198-201中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述结合成员和外源分析物依次或同时加入所述样品中。

203. 权利要求198-201中的任一项的方法,其中在步骤(c)中切割所述标签之前,分离所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物。

204. 权利要求203的方法,其中可以使用磁场完成分离。

205. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和用适体标记的经标记的分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述结合成员特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/结合成员/目标分析物复合物或固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物;(b)除去未结合至所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员的经标记的分析物;(c)解离所述适体,所述适体附接到与所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员结合的经标记的分析物;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e)评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

206. 权利要求205的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。

207. 权利要求206的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌素。

208. 权利要求206的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。

209. 权利要求205-208中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述结合成员和所述经标记的分析物依次或同时加入所述样品中。

210. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和外源分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述外源分析物包含所述固定化试剂的配体且结合所述固体支持物从而形成固体支持物/固定化的分析物复合物,且所述结合成员包含适体且特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/目标分析物/结合成员复合物或固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物;(b)除去未结合在所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物或所述固体支持物/目标分析物/结合成员复合物中的结合成员;(c)解离适体,所述适体结合至所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物中的结合成员;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

211. 权利要求210的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。

212. 权利要求211的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌素。

213. 权利要求211的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。

214. 权利要求210-213中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述结合成员和外源分析物依次或同时加入所述样品中。

215. 权利要求210-213中的任一项的方法,其中在步骤(c)中解离所述适体之前,分离所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物。

216. 权利要求215的方法,其中可以使用磁场完成分离。

用于样品分析的装置和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求于2015年4月3日提交的美国临时专利申请号62/142,872、2016年1月13日提交的美国临时专利申请号62/278,303和2016年1月15日提交的美国临时专利申请号62/279,488的权益,所述申请通过引用整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及使用纳米孔装置(例如,与微流体装置可操作地偶联)进行分析物分析的方法、装置和系统。

背景技术

[0003] 可以准确地分析样品中的目标分析物的方法和装置是诊断、预测、环境评估、食品安全、化学或生物战剂的检测等所必需的。这样的方法和装置不仅需要是准确的、精确的和灵敏的,而且当要快速地且用微型器械分析微小样品时也是有利的。这样,对在具有改善的样品分析能力的方法和装置中存在兴趣。

发明内容

[0004] 本发明的实施方案涉及用于分析样品中的分析物的方法、系统和装置。在某些实施方案中,所述样品可以是生物样品。

[0005] 所述用于分析样品中的分析物的方法可以包括:使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;使所述固体支持物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包括与其附接的可切割标签;除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员;切割与第二结合成员附接的标签,所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物;穿过或横过层中的纳米孔转移所述被切割的标签;确定穿过所述层转移的标签的数目;基于穿过所述层转移的标签的数目确定所述样品中分析物的浓度。在某些实施方案中,通过计数每单位时间穿过所述层转移的标签的数目,可以确定所述分析物的浓度。在其它实施方案中,通过确定穿过所述层转移的标签的数目达到阈值时的时间或通过设定一段时间并计数在设定的时间段中计数的积累数目,可以确定所述分析物的浓度。

[0006] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括:将含有所述靶分析物的样品与已知量的所述靶分析物或竞争分子组合,其中所述靶分析物(与所述样品组合)或所述竞争分子经由可切割的接头附接至标签以分别产生带标签的分析物或带标签的竞争分子,且所述带标签的分析物或带标签的竞争分子与所述靶分析物竞争对第一结合成员的结合。所述方法还可以包括:使所述组合的样品与所述第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述靶分析物(和所述带标签的分析物或带标签的竞争分子);使所述固体支持物与缓冲液接触以进行任选的洗涤步骤;切

割附接至所述带标签的分析物或带标签的竞争物的标签,所述带标签的分析物或带标签的竞争物结合至被固定化在所述固体支持物上的第一结合成员;穿过或横过层中的纳米孔转移所述被切割的标签;确定穿过所述层转移的标签的数目;基于穿过所述层转移的标签的数目确定所述样品中分析物的浓度。在某些实施方案中,通过计数每单位时间穿过所述层转移的标签的数目,可以确定所述分析物的浓度。在其它实施方案中,通过确定穿过所述层转移的标签的数目达到阈值时的时间或通过设定一段时间并计数在设定的时间段中计数的积累数目,可以确定所述分析物的浓度。在该实施方案中,穿过所述纳米孔转移的标签的数目或穿过所述层转移的标签的数目达到阈值时的时间可以与所述样品中分析物的浓度负相关。例如,计数越低或用于达到阈值的时间段越长,所述样品中靶分析物的浓度越高。

[0007] 在一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含与其附接的可切割标签;除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员;切割与第二结合成员附接的标签,所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物;穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述被切割的标签;和评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的标签进行评估,其中穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对检测穿过所述层转移的标签进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0008] 在一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含适体;除去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体;解离与所述分析物结合的适体,并穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的适体进行评估,其中穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对检测穿过所述层转移的适体进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0009] 在一个方面,本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:底基底,其包含电极阵列;与所述底基底间隔的顶基底;和设置在所述底基底和顶基底之间的纳米孔层。所述装置包括近端部分和远端部分,且所述纳米孔层设置在所述远端部分中。在所述近端部分中的电极阵列被构造成产生微滴。所述电极阵列被构造成将所述微滴定位成横过所述纳米孔层,使得所述微滴被所述纳米孔层分割成第一部分和第二部分,其中所述电极阵列的至少两个电极定位成横过所述纳米孔层,其中所述两个电极形成阳极和阴极,并在液体微滴定位成横过所述纳米孔层时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

[0010] 在一个方面,本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:底基底,其包含电极阵列;顶基底,其与所述底基底间隔且包含电极;和设置在所述底基底和顶基底之间的纳米孔层。所述装置包括近端部分和远端部分,且所述纳米孔层设置在所述远端部分中。所述电极阵列和在所述近端部分中的电极被构造成产生微滴。所述电极阵列和所述电极被构造成将所述微滴定位成横过所述纳米孔层,使得所述纳米孔层将所述微滴分割成第一部分和第二部分,其中所述电极阵列的至少一个电极与定位成横过所述纳米孔层的微滴的第一部分发生接触,且所述顶基底中的电极定位成接触定位成横过所述纳米孔层的微滴的第二部分,其中所述两个电极形成阳极和阴极,并在液体微滴定位成横过所述纳米孔层时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

[0011] 在一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述结合成员特异性地结合所述分析物;使所述样品与经标记的分析物接触,所述样品可能含有与所述结合成员结合的分析物,其中所述经标记的分析物用可切割标签标记;除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;切割标签,所述标签附接到与所述结合成员结合的经标记的分析物;穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述被切割的标签;和评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的标签进行评估,其中穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对检测穿过所述层转移的标签进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0012] 在一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与结合成员接触,其中结合成员被固定化在固体支持物上,且其中结合成员特异性地结合所述分析物;使所述样品与经标记的分析物接触,所述样品可能含有与所述结合成员结合的分析物,其中所述经标记的分析物包含适体;除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;解离适体,所述适体结合至与所述结合成员结合的经标记的分析物,并穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的适体进行评估,其中穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对检测穿过所述层转移的适体进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0013] 在一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员用可切割标签标记;使所述样品与固定化的分析物接触,所述样品可能含有与所述结合成员结合的分析物,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;切割标签,所述标签附接到与所述固定化的分析物结合的结合成员;穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述被切割的标签;和评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述

样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的标签进行评估,其中穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对穿过所述层转移的标签进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0014] 在一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员包含适体;使所述样品与固定化的分析物接触,所述样品可能含有与所述结合成员结合的分析物,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;解离适体,所述适体结合至与所述固定化的分析物结合的结合成员,并穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的适体进行评估,其中穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对检测穿过所述层转移的适体进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0015] 在某些方面,所述标签可以是阴离子聚合物、阳离子聚合物或纳米颗粒。在某些情况下,所述标签可以包括阴离子聚合物,例如,寡核苷酸聚合物。在某些情况下,所述寡核苷酸聚合物可以是脱氧核糖核酸或核糖核酸。在某些情况下,所述寡核苷酸聚合物可以是DNA适体或RNA适体,其中所述适体不结合所述分析物。在示例性情况下,所述标签可以包括纳米颗粒,所述纳米颗粒可以是带正电荷的纳米颗粒或带负电荷的纳米颗粒。

[0016] 在某些实施方案中,所述标签可以是球形标签,例如,树枝状聚合物、珠子、纳米颗粒,例如,纳米珠子等。在某些实施方案中,所述标签可以不是线性的或基本上线性的或伸长的形状,例如,核糖或脱氧核糖单元、寡核苷酸和核酸的聚合物,例如,DNA或RNA。

[0017] 在某些情况下,所述第一结合成员和所述第二结合成员可以是适体、抗体或受体。例如,所述第一结合成员可以是受体且所述第二结合成员可以是抗体,或所述第一结合成员可以是抗体且所述第二结合成员可以是受体。在某些情况下,所述第一结合成员可以是第一抗体且所述第二结合成员可以是第二抗体。

[0018] 在某些情况下,所述标签可以是带负电荷的,且所述转移可以包括跨所述层施加正电势由此使所述标签横过所述层转移。

[0019] 在某些情况下,所述标签可以是带正电荷的,且所述转移可以包括跨所述层施加负电势由此使所述标签横过所述层转移。

[0020] 在其它实施方案中,所述标签可以是核酸,且所述标签可以在所述转移之前与寡核苷酸杂交,所述寡核苷酸包括与所述标签的序列互补的序列。

[0021] 在另一个实施方案中,提供了使用适体作为第二结合成员测量存在于生物样品中的分析物的方法。例如,所述方法可以包括:使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含适体;除去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体;从与所述固体基底结合的分析物解离所述适体和将所述解离的适体转移穿过层中的纳米

孔；确定穿过所述层转移的适体的数目；基于穿过所述层转移的适体的数目，测量所述样品中的分析物。在该实施方案中，所述第二结合成员没有附接到标签，因为所述第二结合成员被所述纳米孔直接检测到。

[0022] 所述适体可以是DNA适体或RNA适体。所述第一结合成员可以是抗体。在某些情况下，所述分析物可以是配体，且所述第一结合成员可以是受体。

[0023] 本文中公开了用于同时分析样品中的多种不同分析物的方法，例如，所述方法可以包括分析：第一种和第二种分析物；第一种、第二种和第三种分析物；以此类推。在某些情况下，用于分析样品中的多种不同分析物的方法可以包括使所述样品与多种不同第一结合成员接触，其中所述不同第一结合成员的第一结合成员特异性地结合所述多种不同分析物的第一种分析物，所述不同第一结合成员的第二结合成员特异性地结合所述多种不同分析物的第二种分析物，以此类推。所述方法还可以包括使所述不同分析物与多种第二结合成员接触，其中所述多种第二结合成员的第一结合成员结合所述第一种分析物，所述多种第二结合成员的第二结合成员结合所述第二种分析物，以此类推。在某些情况下，所述多种不同第二结合成员中的每一种可以包括彼此不同或可区分的标签（例如，所述不同第二结合成员中的每一种具有不同的标签）。例如，所述多种第二结合成员的第一结合成员可以包括第一标签，所述多种第二结合成员的第二结合成员可以包括第二标签，以此类推，其中所述第一标签和第二标签是彼此可区分的。区分所述标签可以使用任意合适的方法完成，例如，基于所述标签的性质或特有性能。

[0024] 所述方法还可以包括：除去未结合的第二结合成员；切割标签，所述标签附接到与所述分析物结合的多种第二结合成员；将所述标签转移穿过层中的纳米孔；确定穿过所述层转移的每种标签的数目；基于穿过所述层转移的每种标签的数目，测量所述样品中的多种不同分析物。在某些实施方案中，通过计数每单位时间穿过所述层转移的标签的数目，可以确定所述分析物的浓度。在其它实施方案中，通过确定穿过所述层转移的标签的数目达到阈值时的时间，可以确定所述分析物的浓度。如本文中指出的，在某些情况下，所述第二结合成员可以是多种适体，且在计数所述适体时这些适体没有附接到标签。在这些实施方案中，在穿过或横过纳米孔转移之前，所述适体可以从所述分析物解离。

[0025] 在某些情况下，所述不同标签（诸如所述不同适体）可以通过纳米孔力光谱法、光学装置或电学装置或它们的组合彼此区分。

[0026] 本文中还提供用于实施公开的方法的试剂盒、系统和装置。所述试剂盒、系统和装置可以用于以自动或半自动方式执行分析物分析，且任选地可以包括用于分析物分析的一次用弃的/可消耗的组分。自动和半自动装置可以利用微流体。示例性的微流体包括数字微流体（DMF）、表面声波（SAW）微流体、基于微滴的微流体装置等。示例性的微流体也包括完全集成的DMF和纳米孔装置，或完全集成的SAW和纳米孔装置。在某些情况下，所述用于实施公开的方法的装置可以是与纳米孔装置结合使用的数字微流体装置。在其它实施方案中，所述用于实施公开的方法的装置可以是集成的数字微流体纳米孔装置。这些装置可以是一次性使用的装置，或可以是可重复使用的（多次用于分析物分析）。本文描述的数字微流体装置和纳米孔装置可以提供小型化的低成本分析物分析，且可以使用低成本技术制造。

[0027] 本文中公开了一种集成的数字微流体纳米孔装置，其包含微流体模块和纳米孔模块；所述微流体模块包含与单个电极间隔的电极阵列，所述单个电极的大小设置成与所

述电极阵列的至少一部分重叠,其中所述电极阵列和所述单个电极将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的转移电极,其中所述转移电极定位在可操作地偶联所述微流体模块和所述纳米孔模块的接口处;所述纳米孔模块包含:定位在第一基底的第一表面上的第一微通道;定位在第二基底的第一表面上的第二微通道;其中所述第一基底的第一表面与所述第二基底的第一表面发生接触,由此封闭所述第一微通道和所述第二微通道以分别提供第一毛细管通道和第二毛细管通道,其中至少所述第一毛细管通道延伸至所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口且邻近所述转移电极,并且定位成接收定位在所述转移电极上的流体微滴;其中所述第一毛细管通道与所述第二毛细管通道相交,其中纳米孔层定位在所述第一基底和第二基底之间所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道发生相交的位置。

[0028] 在某些实施方案中,所述电极阵列可以包含第一转移电极和第二转移电极,所述转移电极中的每一个被构造成将流体微滴定位在所述转移电极的表面上,其中所述第一毛细管通道延伸至所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口,邻近所述第一转移电极且定位成接收位于所述第一转移电极上的流体微滴,且其中所述第二毛细管延伸至所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口,邻近所述第二转移电极且定位成接收位于所述第二转移电极上的流体微滴。

[0029] 在某些实施方案中,所述第二毛细管通道可以不延伸至所述接口,且可以不连接至所述微流体模块的电极,且可以连接至在所述第二毛细管的一个或两个末端上的排出口或蓄池。在某些情况下,所述第二毛细管连接至在一个末端处的第一蓄池和在另一个末端处的第二蓄池。

[0030] 在某些实施方案中,所述第一蓄池和/或所述第二蓄池包含流体,所述流体要定位成在相交处在所述第一毛细管通道的对面,所述流体促进所述纳米孔层的运行以驱动电流穿过所述纳米孔层的纳米孔。在某些实施方案中,所述第一毛细管通道和/或所述第二毛细管通道在横过所述毛细管的长度的横截面宽度上变化,使得所述宽度与在所述相交处的任一侧上的宽度相比在所述相交处减小。

[0031] 在某些实施方案中,所述第一毛细管包含第一对电极,且所述第二毛细管包含第二对电极,其中所述第一对电极定位在所述第一毛细管通道中且侧接所述纳米孔层中的纳米孔,且其中第二对电极定位在所述第二毛细管通道且侧接所述纳米孔层中的纳米孔。所述微滴可以是这样的微滴:其包含要通过运输穿过所述纳米孔层中的纳米孔来检测和/或计数的分子。

[0032] 在某些实施方案中,所述流体微滴具有不同的组成且是第一微滴和第二微滴,所述第一微滴包含要通过穿过所述纳米孔横过所述纳米孔层运输来检测和/或计数的分子,且所述第二微滴包含缺乏所述分子的导电流体,其中所述导电流体促进所述分子经由纳米孔横过所述纳米孔层的运输。

[0033] 在某些实施方案中,所述第一毛细管通道包含定位在所述纳米孔层近端的第一电极,且所述第二毛细管通道包含定位在所述纳米孔层近端的第二电极,其中所述第一电极和第二电极中的每一个暴露在所述毛细管通道中,使得它们与存在于所述毛细管通道中的流体发生接触,且其中当液体定位成横过所述第一毛细管通道和第二毛细管通道中的纳米孔层时,所述第一电极和第二电极运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

[0034] 在某些实施方案中,所述转移电极和所述第一毛细管通道是在基本上同一个平面上,且其中所述流体微滴与所述第一毛细管通道的开口对齐。

[0035] 在某些实施方案中,所述转移电极是在比所述第一毛细管通道更高的平面处,且其中所述装置被构造成具有垂直端口,所述垂直端口用于将所述流体微滴向下转移至所述第一毛细管通道的开口。

[0036] 在一个特定实施方案中,所述第一基底的第一表面包含在其上面设置所述电极阵列的第一区域和在其中形成所述第一微通道的第二区域,其中所述电极阵列是在这样的平面上:所述平面高于在其上面形成所述第一微通道的平面。

[0037] 在某些实施方案中,所述第二基底在位于所述接口的侧边缘处包含凹槽,其中所述凹槽在所述第一毛细管通道上面对齐并提供垂直端口,所述垂直端口用于将位于所述转移电极处的微滴运输至所述第一毛细管通道的开口。

[0038] 在某些情况下,所述单个电极在所述单个转移电极上面延伸且与所述单个转移电极处于双平面构型,且其中所述单个电极和所述单个转移电极运行以使所述单个流体微滴向所述单个转移电极移动。

[0039] 在其它情况下,所述单个电极在所述多个转移电极上面延伸且与所述多个转移电极处于双平面构型,且其中所述单个电极和所述多个转移电极运行以使所述多个流体微滴向所述多个转移电极移动。

[0040] 在某些实施方案中,所述单个电极不在所述单个转移电极上面延伸且不与所述单个转移电极处于双平面构型,其中通过使用共面电极使所述单个流体微滴向所述单个转移电极移动。

[0041] 在某些实施方案中,所述单个电极不在所述多个转移电极上面延伸且不与所述多个转移电极处于双平面构型,其中通过使用共面电极使所述多个流体微滴向所述多个转移电极移动。

[0042] 因而,使用如本文中所述的装置、试剂盒、系统和方法,可以测量存在于生物样品中的分析物,且可以诊断患者。

[0043] 在另一个方面,本发明涉及一种测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物,(b)使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含与其附接的可切割标签,(c)除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员,(d)切割与第二结合成员附接的标签,所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物,(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签,和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0044] 在另一个方面,本发明涉及一种测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、第一特异性结合成员和第二特异性结合成员接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述第一特异性结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述第一特异性结合成员特异性地结合所述目标分析物,所述第二特异性结合成员包含可切割标签,且所述第二特异性结合成员特异性地结合所述目标分析物,

其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/目标分析物/第二特异性结合成员复合物, (b) 除去未结合至所述固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物的第二特异性结合成员, (c) 切割标签, 所述标签附接到与所述固体支持物/第一特异性结合成员/目标分析物/第二特异性结合成员复合物中的第二特异性结合成员结合的经标记的分析物, (d) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签, 和 (e) 评估穿过所述层转移的标签, 其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量, 或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0045] 在另一个方面, 本发明涉及一种测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法, 所述方法包括: (a) 使所述样品与第一结合成员接触, 其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上, 且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物, (b) 使所述分析物与第二结合成员接触, 其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物, 且其中所述第二结合成员包含适体, (c) 除去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体, (d) 解离与所述分析物结合的适体, (e) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体, 和 (f) 评估穿过所述层转移的适体, 其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量, 或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

[0046] 在一个方面, 本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔装置, 其包含: 第一基底, 其包含电极阵列; 与所述第一基底间隔的第二基底; 和设置在所述第一基底和第二基底之间的纳米孔层, 其中所述电极阵列被构造成将所述微滴定位成横过所述纳米孔层, 使得所述微滴被所述纳米孔层分割成第一部分和第二部分, 其中所述电极阵列的至少两个电极定位成横过所述纳米孔层, 其中所述两个电极形成阳极和阴极, 并在液体微滴定位成横过所述纳米孔层时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

[0047] 在另一个方面, 本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔装置, 其包含: 第一基底, 其包含电极阵列; 与所述第一基底间隔的第二基底; 和设置在所述第一基底和第二基底之间的纳米孔层, 其中所述电极阵列被构造成将所述微滴定位成横过所述纳米孔层, 使得所述纳米孔层将所述微滴分割成第一部分和第二部分, 其中所述电极阵列的至少一个电极与定位成横过所述纳米孔层的微滴的第一部分发生接触, 且所述第二基底中的电极定位成接触定位成横过所述纳米孔层的微滴的第二部分, 其中所述两个电极形成阳极和阴极, 并在液体微滴定位成横过所述纳米孔层时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

[0048] 在另一个方面, 本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法, 所述方法包括: (a) 使所述样品与结合成员接触, 其中所述结合成员被固定化在固体支持物上, 且其中所述结合成员特异性地结合所述分析物, (b) 使所述样品与经标记的分析物接触, 其中所述经标记的分析物用可切割标签标记, (c) 除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物, (d) 切割标签, 所述标签附接到与所述结合成员结合的经标记的分析物, (e) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签, 和 (f) 评估穿过所述层转移的标签, 其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量, 或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0049] 在另一个方面, 本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法, 所述方法包括: (a) 使所述样品与结合成员接触, 其中结合成员被固定化在固体支持物上, 且其中结合成员特异性地结合所述分析物, (b) 使所述样品与经标记的分析物接触, 其

中所述经标记的分析物包含适体；(c) 除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物，(d) 解离结合至所述经标记的分析物的适体，并穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体，和 (e) 评估穿过所述层转移的适体，其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

[0050] 在另一个方面，本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法，所述方法包括：(a) 使所述样品与结合成员接触，其中所述结合成员特异性地结合所述分析物，且所述结合成员用可切割标签标记，(b) 使所述样品与固定化的分析物接触，其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上，(c) 除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员，(d) 切割标签，所述标签附接到与所述固定化的分析物结合的结合成员，(e) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签，和 (f) 评估穿过所述层转移的标签，其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0051] 在另一个方面，本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法，所述方法包括：(a) 使所述样品与结合成员接触，其中所述结合成员特异性地结合所述分析物，且所述结合成员包含适体，(b) 使所述样品与固定化的分析物接触，其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上，(c) 除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员，(d) 解离适体，所述适体结合至与所述固定化的分析物结合的结合成员，并穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体，和 (e) 评估穿过所述层转移的适体，其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

[0052] 在另一个方面，本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔装置，其包含微流体模块和纳米孔模块；所述微流体模块包含电极阵列，其中所述电极阵列将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的第一转移位置，其中所述第一转移位置是在所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口处；所述纳米孔模块包含：第一毛细管通道；和第二毛细管通道；其中至少所述第一毛细管通道延伸至所述接口且邻近所述第一转移位置，并且定位成接收定位在所述第一转移位置处的流体微滴；其中所述第一毛细管通道与所述第二毛细管通道相交，其中纳米孔层定位在所述第一毛细管通道和第二毛细管通道之间所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道发生相交的位置。

[0053] 在另一个方面，本发明涉及一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法，所述方法包括：(a) 使所述样品与第一结合成员接触，其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上，且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物，(b) 使所述分析物与第二结合成员接触，其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物，且其中所述第二结合成员包含与其附接的可切割标签，(c) 除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员，(d) 切割与第二结合成员附接的标签，所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物，(e) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签，和 (f) 评估穿过所述层转移的标签，其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件，其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量：i) 计数在设定的时间段内转移事件的数目，并将所述转移事件的数目与对照关联；ii) 测量发

生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii) 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0054] 在另一个方面,本发明涉及一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物,(b)使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含适体,(c)除去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体,(d)解离与所述分析物结合的适体,和(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(f)评估穿过所述层转移的适体,其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0055] 在另一个方面,本发明涉及用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,(b)使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述经标记的分析物用可切割标签标记,(c)除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物,(d)切割标签,所述标签附接到与所述结合成员结合的经标记的分析物,(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签,和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0056] 在另一个方面,本发明涉及一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中结合成员被固定化在固体支持物上,且其中结合成员特异性地结合所述分析物,(b)使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述

经标记的分析物包含适体, (c) 除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物, (d) 解离结合至所述经标记的分析物的适体, 并穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体, 和 (e) 评估穿过所述层转移的适体, 其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件, 其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量, 其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量: i) 计数在设定的时间段内转移事件的数目, 并将所述转移事件的数目与对照关联; ii) 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联; 或 iii) 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联, 其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准, 其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项 i) 中的标准曲线; 其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项 ii) 中的标准曲线; 且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项 iii) 中的标准曲线。

[0057] 在另一个方面, 本发明涉及一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法, 所述方法包括: (a) 使所述样品与结合成员接触, 其中所述结合成员特异性地结合所述分析物, 且所述结合成员用可切割标签标记, (b) 使所述样品与固定化的分析物接触, 其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上, (c) 除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员, (d) 切割标签, 所述标签附接到与所述固定化的分析物结合的结合成员, (e) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签, 和 (f) 评估穿过所述层转移的标签, 其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件, 其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量, 其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量: i) 计数在设定的时间段内转移事件的数目, 并将所述转移事件的数目与对照关联; ii) 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联; 或 iii) 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联, 其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准, 其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项 i) 中的标准曲线; 其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项 ii) 中的标准曲线; 且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项 iii) 中的标准曲线。

[0058] 在另一个方面, 本发明涉及一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法, 所述方法包括: (a) 使所述样品与结合成员接触, 其中所述结合成员特异性地结合所述分析物, 且所述结合成员包含适体, (b) 使所述样品与固定化的分析物接触, 其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上, (c) 除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员, (d) 解离适体, 所述适体结合至与所述固定化的分析物结合的结合成员, 并穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体, 和 (e) 评估穿过所述层转移的适体, 其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件, 其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量, 其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量: i) 计数在设定的时间段内转移事件的数目, 并将所述转移事件的数目与对照关联; ii) 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联; 或 iii) 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联, 其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准, 其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项 i) 中的标准曲线; 其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项 ii) 中的标准曲线; 且其

中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0059] 在另一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员被固定化在固体支持物上,所述结合成员包含与其附接的可切割标签,且所述结合成员特异性地结合所述分析物,(b)除去未结合至所述分析物的结合成员,(c)切割标签,所述标签附接到与所述分析物结合的结合成员,(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签,和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参照。

[0060] 在另一个方面,本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔实现装置,其包含:微流体模块和纳米孔实现模块;所述微流体模块包含与单个电极间隔的电极阵列,所述单个电极的大小设置成与所述电极阵列的至少一部分重叠,其中所述电极阵列和所述单个电极将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的转移电极,其中所述转移电极定位在所述微流体模块和所述纳米孔实现模块之间的接口处;所述纳米孔实现模块包含:定位在第一基底的第一表面上的第一微通道;定位在第二基底的第一表面上的第二微通道;其中所述第一基底的第一表面与所述第二基底的第一表面发生接触,由此封闭所述第一微通道和所述第二微通道以分别提供第一毛细管通道和第二毛细管通道,其中至少所述第一毛细管通道延伸至所述微流体模块和所述纳米孔实现模块之间的接口且邻近所述转移电极,并且定位成接收定位在所述转移电极上的流体微滴;其中所述第一毛细管通道与所述第二毛细管通道相交,其中一个层定位在所述第一基底和第二基底之间所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道发生相交的位置,其中所述层缺乏纳米孔且分离存在于所述第一毛细管通道和第二毛细管通道中的离子液体,其中所述第一毛细管通道和第二毛细管通道与用于驱动从所述第一毛细管通道至所述第二毛细管通道(或反之亦然)的电压的电极发生电连接以在所述层中在所述第一毛细管通道和第二毛细管通道的相交处建立纳米孔。

[0061] 在另一个方面,本发明涉及一种用于在集成的数字微流体纳米孔实现装置中产生纳米孔的方法,所述方法包括:提供如前文所述的集成的数字微流体纳米孔实现装置;在所述第一毛细管通道和第二毛细管通道中施加电压以驱动电流穿过所述层;测量跨所述层的电导;在检测到指示纳米孔在所述层中产生的电导后,终止电压的施加。

[0062] 在另一个方面,本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;在所述第一基底或第二基底中的开口,所述开口与包含纳米孔的纳米孔层流体连通;和一对电极,所述电极被构造成穿过所述纳米孔施加电场,其中所述电极阵列被构造成将流体的至少一个微滴运输至所述开口。

[0063] 在另一个方面,本发明涉及一对集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:前文描述的第一个集成的数字微流体纳米孔装置,其中所述单个电极是第一单个电极,且所述毛细管通道是第一毛细管通道;和第二个集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第三基底,其包含第五侧面和与所述第五侧面相对的第六侧面,其中所述第五侧面包含电极阵列;与所

述第三基底间隔的第四基底,其中所述第四基底包含面向所述第三基底的第五侧面的第七侧面和与所述第七侧面相对的第八侧面,其中所述第七侧面包含第二单个电极,且其中所述纳米孔层设置在所述第八侧面上,其中所述第四基底包含从所述第四基底的第七侧面延伸至第八侧面的第二毛细管通道,其中所述纳米孔层定位在所述毛细管通道的开口上面,其中所述纳米孔层介于所述第二基底和所述第四基底之间,使得所述纳米孔提供在所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道之间的电渗导管,其中所述检测电极对包含第二检测电极,其为所述第二单个电极。

[0064] 在另一个方面,本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔实现装置,其包含:第一基底,其包含第一侧面和与所述第一侧面相对的第二侧面,其中所述第一侧面包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底,其中所述第二基底包含面向所述第一基底的第一侧面的第三侧面和与所述第三侧面相对的第四侧面;纳米孔实现层,其缺乏纳米孔且设置在所述装置的外侧面上,其中所述外侧面选自所述第二侧面或所述第四侧面,其中包含所述外侧面的第一基底或第二基底之一包含毛细管通道,所述毛细管通道从所述第一基底的第一侧面延伸至第二侧面或者从所述第二基底的第三侧面延伸至第四侧面,其中所述纳米孔实现层定位在所述毛细管通道的开口上面;和一对电极,所述电极被构造成跨所述纳米孔实现层施加电场,其中所述电极阵列被构造成将流体的至少一个微滴运输至所述毛细管通道。

[0065] 在另一个方面,本发明涉及一种用于在集成的数字微流体纳米孔实现装置中产生纳米孔的方法,其包含:提供前文描述的集成的数字微流体纳米孔实现装置;将所述纳米孔实现层的两个侧面浸入离子液体中,使得在所述层的每个侧面上的离子液体与所述检测电极对的任一个发生电接触;在所述检测电极对之间施加电压以驱动电流穿过所述层;测量跨所述层的电导;在检测到指示纳米孔在所述层中产生的电导后,终止电压的施加。

[0066] 在另一个方面,本发明涉及一种包含结合成员、标签和间隔物的组合物。

[0067] 在另一个方面,本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;和纳米孔层,其具有设置在所述第一基底和第二基底之间的第一表面和第二表面,其中所述电极阵列被构造成将第一微滴定位在所述纳米孔层的第一表面处,其中所述电极阵列的至少两个电极定位成横过所述纳米孔层,其中所述两个电极形成阳极和阴极,并在液体微滴是在所述纳米孔层的第一表面处时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

[0068] 在另一个方面,本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含微流体模块和纳米孔模块;所述微流体模块包含电极阵列,其中所述电极阵列将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的转移位置,其中所述转移位置是在所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口处;所述纳米孔模块包含:从所述转移位置延伸至纳米孔层的第一毛细管通道。

[0069] 在另一个方面,本发明涉及一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;在其中具有一个或多个纳米孔的第一纳米孔层;在其中具有一个或多个纳米孔的第二纳米孔层;和至少两个电极,其用于建立电场以驱动标签穿过所述第一纳米孔层和第二纳米孔层中的纳米孔。

[0070] 在另一个方面,本发明涉及一种试剂盒,其包含用于用在任意前述方法中的任意

前述装置。

[0071] 在另一个方面,本发明涉及一种使用任意前述装置用于测量或检测存在于生物样品中的分析物或用于诊断患者或筛查血液供给的方法。

[0072] 在另一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和用可切割标签标记的经标记的分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述结合成员特异性地结合所述目标分析物以形成固体支持物/结合成员/目标分析物复合物或固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物;(b)除去未结合至所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员的经标记的分析物;(c)切割标签,所述标签附接到与所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员结合的经标记的分析物;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0073] 在另一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和外源分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述外源分析物包含所述固定化试剂的配体且结合所述固体支持物从而形成固体支持物/固定化的分析物复合物,且所述结合成员包含可切割标签且特异性地结合所述目标分析物以形成固体支持物/目标分析物/结合成员复合物或固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物;(b)除去未结合在所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物或所述固体支持物/目标分析物/结合成员复合物中的结合成员;(c)切割标签,所述标签附接到所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物中的结合成员;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0074] 在另一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和用可切割标签标记的经标记的分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述结合成员特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/结合成员/目标分析物复合物或固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物;(b)除去未结合至所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员的经标记的分析物;(c)切割标签,所述标签附接到与所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员结合的经标记的分析物;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0075] 在另一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和外源分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述外源分析物包含所述固定化试剂的配体且结合所述固体支持物从而形成固体支持物/固定化的分析物复合物,且所述结合成员包含可切割标签且特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/目标分析物/结合成员复合物或固

体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物；(b) 除去未结合在所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物或所述固体支持物/目标分析物/结合成员复合物中的结合成员；(c) 切割标签,所述标签附接到所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物中的结合成员；(d) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签；和(e) 评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0076] 在另一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a) 使所述样品与固体支持物、结合成员和用适体标记的经标记的分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述结合成员特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/结合成员/目标分析物复合物或固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物；(b) 除去未结合至所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员的经标记的分析物；(c) 解离所述适体,所述适体附接到与所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员结合的经标记的分析物；(d) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体；和(e) 评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

[0077] 在另一个方面,本发明涉及一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a) 使所述样品与固体支持物、结合成员和外源分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述外源分析物包含所述固定化试剂的配体且结合所述固体支持物从而形成固体支持物/固定化的分析物复合物,且所述结合成员包含适体且特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/目标分析物/结合成员复合物或固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物；(b) 除去未结合在所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物或所述固体支持物/目标分析物/结合成员复合物中的结合成员；(c) 解离适体,所述适体结合至所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物中的结合成员；(d) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签；和(e) 评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

附图说明

[0078] 本文阐述的主题的细节(关于它的结构和运行)可以通过研究附图而明白,在附图中,相同的附图标记表示相同的部件。附图中的部件不一定按比例,而是把重点放在解释主题的原理。此外,所有插图意图传达概念,其中可以示意地、而不是按照字面上或精确地解释相对大小、形状和其它详细属性。

[0079] 图1A和图1B描绘了与纳米孔装置15结合使用的微流体装置10。

[0080] 图2A和图2B描绘了可逆集成装置的示意图,所述可逆集成装置具有经由通道40与纳米孔模块30组合的微流体模块20。图2C-2L描绘了示例性集成装置的示意图,其中微流体模块与纳米孔模块流体连通。所述纳米孔模块包括在层中的纳米孔,所述层在两个微流体通道相交的位置处物理上分离所述两个微流体通道。

- [0081] 图3解释了一种示例性集成装置,其包括微流体模块300和纳米孔模块325。
- [0082] 图4提供了一种集成装置400,其中所述数字微流体模块包括嵌入式纳米孔模块。
- [0083] 图5A显示了一种集成装置的顶视图。图5B显示了图5A的集成装置的侧视图。
- [0084] 图6描绘了本发明的一种示例性装置和方法。
- [0085] 图7描绘了本发明的一种示例性装置和方法。
- [0086] 图8描绘了本发明的一种示例性集成装置的侧视图。
- [0087] 图9描绘了本发明的一种示例性系统。
- [0088] 图10描绘了低成本DMF芯片的制造过程的示意图。
- [0089] 图11描绘了根据图10中的示意图制造的单个柔性DMF芯片。
- [0090] 图12描绘了根据本发明的实施方案,DMF芯片中的微滴的驱动。
- [0091] 图13A-13E描绘了根据本发明的实施方案,DMF芯片中的免疫测定的执行。
- [0092] 图14A-14C描绘了根据本发明的实施方案,纳米孔模块的制造和设计。
- [0093] 图15A显示了实时测量的泄漏电流的图。图15B描绘了纳米孔的电流-电压(I-V)曲线。
- [0094] 图16A和图16B显示了根据本发明的实施方案,集成的DMF-纳米孔模块装置中的毛细管通道的填充。
- [0095] 图17显示了根据本发明的实施方案,集成的DMF-纳米孔模块装置中的模块之间的微滴转移的示意图。
- [0096] 图18显示了根据本发明的实施方案,纳米孔模块设计的示意图。
- [0097] 图19显示了根据本发明的实施方案,能够通过被动运输执行模块之间的微滴转移的集成的DMF-纳米孔模块装置的示意图。
- [0098] 图20显示了根据本发明的实施方案,能够通过被动运输执行模块之间的微滴转移的集成的DMF-纳米孔模块装置的示意图。
- [0099] 图21是根据本发明的实施方案,含有硅微通道的硅微流体装置的示意图,所述硅微通道允许通过被动运输进行液体微滴的被动移动。
- [0100] 图22是根据本发明的实施方案,硅微流体装置的硅微通道的图像,所述硅微流体装置允许通过被动运输进行液体微滴的被动移动。
- [0101] 图23A和图23B显示了根据本发明的实施方案,集成的纳米孔传感器的制造方法的示意图。
- [0102] 图24A-24C显示了使用显示穿过以下纳米孔的转移事件得到的图的散布图(水平持续时间相对于阻断水平):(图24A)包含常规双链DNA(“dsDNA”)的纳米孔;(图24B)包含DBC0修饰的dsDNA的纳米孔;和(图24C)包含dsDNA星的纳米孔。
- [0103] 图25显示了巯基介导的化学切割的示意图。
- [0104] 图26A和图26B显示了在磁性微粒上执行的光切割实验的示意图。
- [0105] 图27显示了DMF芯片上的试剂布置的示意图。
- [0106] 图28显示了样品相对于以秒⁻¹为单位的纳米孔通量(DMF切割)的条形图。
- [0107] 图29显示了用于确定数字信号计数的阈值的方式。
- [0108] 图30A-30C显示了对于94 nM(图30A)、182 nM(图30B)和266 nM(图30C)的三种标准品在不同时间段的电流阻断。

- [0109] 图31显示了在固定时间量(5 min)内的事件数目的剂量-响应曲线。
- [0110] 图32显示了固定事件数目所需的时间的剂量-响应曲线。
- [0111] 图33显示了每单位时间的事件的剂量-响应曲线。
- [0112] 图34显示了使用Seq31-SS-生物素时每单位时间的事件的剂量-响应曲线。
- [0113] 图35显示了根据本发明的实施方案,硅纳米孔模块中的纳米孔隔室设计的示意图。
- [0114] 图36显示的表列出了根据本发明的实施方案,在硅纳米孔模块的纳米孔隔室中的COMSOL电场模拟所用的物理参数。
- [0115] 图37的一组图像显示了根据本发明的实施方案,在硅纳米孔模块中的纳米孔附近的抗衡离子浓度梯度的模拟结果。
- [0116] 图38的图显示了根据本发明的实施方案,在具有纳米孔的纳米孔膜上制备的SiO₂ via的直径对穿过纳米孔的电渗流的影响。
- [0117] 图39的图显示了根据本发明的实施方案,在具有纳米孔的纳米孔膜上制备的SiO₂ via的直径对穿过纳米孔的电导的影响。
- [0118] 图40显示了根据本发明的实施方案,具有纳米孔模块的集成的DMF-纳米孔模块装置的示意图,所述纳米孔模块定位在DMF模块的一个侧面上。
- [0119] 图41的一组图像显示了根据本发明的实施方案,来自DMF模块的液体通过毛细管力穿过DMF模块基底中的孔的运动。
- [0120] 图42的一组图像显示了根据本发明的实施方案的集成的DMF-纳米孔模块装置,其具有定位在DMF模块的一个侧面上的纳米孔模块和为纳米孔制造构造的电极。
- [0121] 图43是根据本发明的实施方案的集成的DMF-纳米孔模块装置的示意图,所述装置具有定位在DMF模块的一个侧面上的纳米孔模块。
- [0122] 图44是根据本发明的实施方案的集成的DMF-纳米孔模块装置的示意图,所述装置具有定位在两个DMF模块之间的纳米孔模块。
- [0123] 图45的图显示了根据本发明的实施方案,通过跨纳米孔膜施加电压在纳米孔膜中制造纳米孔(透射电子显微镜(TEM)窗口),且如通过介质击穿证实的。
- [0124] 图46A和图46B的一组图显示了根据本发明的实施方案,在调节过程之前和之后,在膜中形成的纳米孔的电流-电压(I-V)曲线。
- [0125] 图47显示了在计数标记平均直径和纳米孔大小之间绘制的比率的平均值相对于SNR(信噪比)的散布图。

[0126] 发明详述

本发明的实施方案涉及用于分析样品中的分析物的方法、系统和装置。在某些实施方案中,所述样品可以是生物样品。

[0127] 1. 定义

在描述本发明的实施方案之前,应当理解,本发明不限于描述的特定实施方案,因为这些当然可以变化。还应该理解,本文中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,且无意进行限制。

[0128] 本文中使用的“包含”、“包括”、“具有”、“可以”“含有”及其变体意图是开放式的过渡短语、术语或词语,其不排除另外动作或结构的可能性。单数形式“一个/种”、“且”和“所

述”包括复数所指,除非上下文另外清楚地指明。本发明也预见到“包含”本文呈现的实施方案或元件、“由其组成”和“基本上由其组成”的其它实施方案,不论是否明确地阐述。

[0129] 就本文中列举的数字范围而言,明确地预见到具有相同精确度的在二者之间的每个插入数字。例如,就6-9的范围而言,除了6和9以外还预见到数字7和8,且就范围6.0-7.0而言,明确地预见到数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0130] 在本文中可互换地使用的“亲和力”和“结合亲和力”表示结合成员与分析物的结合的趋势或强度。例如,结合亲和力可以由平衡解离常数(K_D)、解离速率(k_d)或结合速率(k_a)表示。

[0131] 本文中使用的“类似物”表示具有与目标分子类似的结构分子(例如,核苷类似物、核苷酸类似物、糖磷酸酯类似物、分析物类似物等)。分析物类似物是在结构上类似于分析物、但是结合成员对其具有不同亲和力的分子。

[0132] 本文中使用的“适体”表示可以以高亲和力和特异性结合预选靶标(包括小分子、蛋白和肽等)的寡核苷酸或肽分子。由于它们的形成螺旋和单链环的倾向,适体可以呈多种形状。寡核苷酸或核酸适体可以是单链DNA或RNA(ssDNA或ssRNA)分子。肽适体可以包括短的可变肽结构域,其在两个末端处附接至蛋白支架。

[0133] “珠子”和“颗粒”在本文中可互换地使用,且表示基本上球形的固体支持物。

[0134] “组分”、“多种组分”或“至少一种组分”通常表示捕获抗体、检测试剂或缀合物、校准物、对照、灵敏度实验对象组、容器、缓冲液、稀释剂、盐、酶、酶的辅因子、检测试剂、预处理试剂/溶液、底物(例如,作为溶液)、停止溶液等,其根据本文所述的方法和本领域中已知的其它方法可以被包括在用于测定测试样品(诸如患者尿、血清、全血、组织抽吸物或血浆样品)的试剂盒中。一些组分可以是在溶液中或者被冻干以重构用于测定。

[0135] 本文中使用的“对照”表示分析物的参比标准,诸如本领域中已知的或接受的,或使用可接受的方式凭经验确定,诸如通常采用的。“参比标准”是用作类似物质的测量基础的标准化物质。例如,在U.S. Pharmacopeial Convention (USP-NF), Food Chemicals Codex, and Dietary Supplements Compendium(它们都可在<http://www.usp.org>得到)和其它众所周知的来源中公开了经记载的参比标准。在文献中描述了用于标准化参考文献的方法。还众所周知的是,通过使用分析物的校正曲线或通过替代参比标准进行对比,定量存在的分析物的量的方式。通过质谱法、比重测定方法和通过本领域已知的其它技术,可以使用已知浓度的分析物的系列稀释物或溶液产生标准曲线。在文献中已经描述的替代参比标准包括标准添加(也被称作标准添加方法)或数字聚合酶链式反应。

[0136] 在本文中可互换地使用的“数字微流体(DMF)”、“数字微流体模块(DMF模块)”或“数字微流体装置(DMF装置)”表示利用数字的或基于微滴的微流体技术来提供分散的且小体积的微滴形式的液体的操纵的模块或装置。数字微流体使用乳剂科学的原理来在通道中建立流体-流体分散(主要是油包水乳剂)。它允许产生单分散滴/泡或具有非常低的多分散性。数字微流体是基于可重构网络内不连续流体微滴的显微操作。通过组合微滴形成、转移、分拆和合并的基本操作,可以将复杂指令程序化。

[0137] 数字微流体在离散体积的流体上运行,其可以由二元电信号操纵。通过使用离散的单位体积微滴,可以将微流体操作定义为一组重复的基本操作,即,使一个单位的流体移动一个单位的距离。使用液体的表面张力性质可以形成微滴。微滴的驱动是基于由电极产

生的静电力的存在,所述电极放在所述微滴所位于的底表面下方。可以使用不同类型的静电力来控制微滴的形状和运动。可以用于建立前述静电力的一种技术是基于介电电泳,其依赖于微滴和周围介质之间的电容率差异,且可以利用高频率AC电场。可以用于建立前述静电力的另一种技术是基于电润湿,其依赖于存在于表面上的液体微滴和所述表面之间的表面张力对施加于所述表面的电场的依赖。

[0138] “拖拉标签”表示迁移率修饰剂。拖拉标签可以是遗传工程改造的高度重复性多肽(“蛋白聚合物”),其被设计成大的、水溶性的和完全单分散的。可以将带正电荷的精氨酸以规律间隔有意地引入氨基酸序列中以增加流体动力学拖拉,而不增加拖拉标签长度。拖拉标签描述在美国专利公开号20120141997中,其通过引用并入本文。

[0139] 本文中使用的“酶可切割序列”表示可以被酶切割的任何核酸序列。例如,所述酶可以是蛋白酶或内切核酸酶,诸如限制性内切核酸酶(也称作限制性酶)。限制性内切核酸酶能够在预定核苷酸之间的特定DNA切割位点处识别和切割DNA分子。一些内切核酸酶(例如FokI)包含切割结构域,其在特定位置非特异性地切割DNA,不论存在于该位置的核苷酸。在某些实施方案中,限制性内切核酸酶的特异性DNA切割位点和DNA识别位点是相同的。

[0140] “球状蛋白”表示具有大致球形的水溶性蛋白。球状蛋白的例子包括但不限于卵白蛋白、 β -球蛋白、C-反应蛋白、纤维蛋白、血红蛋白、IgG、IgM和凝血酶。

[0141] 在本文中可互换地使用的“标记”或“可检测标记”表示通过可切割的接头附接到特异性结合成员或分析物的标签。

[0142] “纳米颗粒”和“纳米珠子”在本文中可互换地使用,且表示具有转移穿过或横过纳米孔的尺寸的纳米珠子或纳米颗粒,所述纳米孔用于计数穿过它的纳米珠子/纳米颗粒的数目。

[0143] “核苷碱基”或“碱基”是指核酸或多核苷酸技术或肽核酸技术领域通常已知的用于产生聚合物的那些天然存在的和合成的杂环部分。合适的核苷碱基的非限制性例子包括:腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶、2-硫-5-丙炔基-尿嘧啶、5-甲基胞嘧啶、假异胞嘧啶、2-硫尿嘧啶和2-硫胸腺嘧啶、2-氨基嘌呤、N9-(2-氨基-6-氯嘌呤)、N9-(2,6-二氨基嘌呤)、次黄嘌呤、N9-(7-脱氮-鸟嘌呤)、N9-(7-脱氮-8-氮杂-鸟嘌呤)和N8-(7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤)。核苷碱基可以连接至其它部分以形成核苷、核苷酸和核苷/核苷酸类似物。

[0144] “核苷”表示由在1'位与戊糖(诸如核糖、2'-脱氧核糖或2',3'-二脱氧核糖)的端基异构碳相连的嘌呤、脱氮嘌呤或嘧啶核苷碱基(例如,腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟苷)组成的化合物。

[0145] 本文中使用的“核苷酸”表示核苷的磷酸酯,例如,单-、二-或三-磷酸酯,其中最常见的酯化位点是附接到戊糖的C-5位置的羟基。

[0146] “核苷碱基聚合物”或“核苷碱基寡聚体”表示通过键连接以形成寡聚体的两个或更多个核苷碱基。核苷碱基聚合物或寡聚体包括、但不限于:多核苷酸和寡核苷酸(例如,DNA和RNA聚合物和寡聚体)、多核苷酸和寡核苷酸类似物和多核苷酸和寡核苷酸模仿物,诸如聚酰胺或肽核酸。核苷碱基聚合物或寡聚体可以在大小上从几个核苷碱基至几百个核苷碱基或至几千个核苷碱基变化。所述核苷碱基聚合物或寡聚体可以包括约2-100个核苷碱基或约8000-10000个核苷碱基。例如,所述核苷碱基聚合物或寡聚体可以具有至少约2个核

核苷碱基、至少约5个核苷碱基、至少约10个核苷碱基、至少约20个核苷碱基、至少约30个核苷碱基、至少约40个核苷碱基、至少约50个核苷碱基、至少约60个核苷碱基、至少约70个核苷碱基、至少约80个核苷碱基、至少约90个核苷碱基、至少约100个核苷碱基、至少约200个核苷碱基、至少约300个核苷碱基、至少约400个核苷碱基、至少约500个核苷碱基、至少约600个核苷碱基、至少约700个核苷碱基、至少约800个核苷碱基、至少约900个核苷碱基、至少约1000个核苷碱基、至少约2000个核苷碱基、至少约3000个核苷碱基、至少约4000个核苷碱基、至少约5000个核苷碱基、至少约6000个核苷碱基、至少约7000个核苷碱基、至少约8000个核苷碱基、至少约9000个核苷碱基或至少约10000个核苷碱基。

[0147] “层中的一个或多个纳米孔”是指，在单膜结构或多膜结构中，存在一个纳米孔，或存在多个彼此靠近（例如，并联）的纳米孔（例如，两个或更多个）。当存在一个或多个纳米孔（例如，1、2、3、4、5、6或其它数目的纳米孔，只要技术上可行）时，它们任选地并联（例如，彼此靠近）或串联（例如，一个层中的一个纳米孔如下存在：与另一个层中的另一个纳米孔分离，或者堆叠于另一个层中的另一个纳米孔上面（例如，在上方或在上部），等）存在，或以交替结构存在，诸如本领域技术人员会明白的。任选地，这样的纳米孔是独立地可寻址的，例如，通过使每个处于它自己的单独隔室中（例如，用壁与任意其它纳米孔间隔），或可替代地可以通过独立检测电路寻址。

[0148] “聚合物刷子”表示用一个末端附接至表面的聚合物层。所述聚合物靠近在一起并形成层或包被，所述层或包被形成它自身的环境。所述刷子可以处于溶剂状态（当悬挂链浸入溶剂中时）或处于熔化状态（当悬挂链完全填满可用空间时）。另外，当聚合物链本身携带静电荷时，存在单独类别的聚电解质刷子。所述刷子可以通过高密度的移植链来表征。有限的空间然后导致链的强延伸和系统的罕见性能。刷子可以用于稳定胶体、减少表面之间的摩擦和提供人工关节中的润滑。

[0149] “多核苷酸”或“寡核苷酸”表示核苷碱基聚合物或寡聚体，其中核苷碱基通过糖磷酸酯键（糖-磷酸酯主链）连接。示例性的多核苷酸和寡核苷酸包括2'-脱氧核糖核苷酸的聚合物（DNA）和核糖核苷酸的聚合物（RNA）。多核苷酸可以完全由核糖核苷酸组成，完全由2'-脱氧核糖核苷酸组成，或由它们的组合组成。“核酸”包括“多核苷酸”和“寡核苷酸”，且包括核苷酸单体的单链和双链聚合物。

[0150] “多核苷酸类似物”或“寡核苷酸类似物”表示核苷碱基聚合物或寡聚体，其中核苷碱基通过包含一个或多个糖磷酸酯类似物的糖磷酸酯主链连接。典型的糖磷酸酯类似物包括、但不限于：糖烷基膦酸酯、糖氨基亚膦酸酯、糖烷基膦酸三酯或取代的烷基膦酸三酯、糖硫代膦酸酯、糖二硫代膦酸酯、糖膦酸酯和糖膦酸酯类似物，其中所述糖是2'-脱氧核糖或核糖以外的糖，核苷碱基聚合物具有带正电荷的糖-胍基互连，诸如在美国专利号6,013,785和美国专利号5,696,253中描述的那些。

[0151] 本文中使用的“孔”（可替代地在本文中被称作“纳米孔”）或“通道”（可替代地在本文中被称作“纳米孔”或“纳米通道”）表示膜/层中的孔口、间隙、导管或槽，其中所述孔或通道具有足够的尺寸，其一次允许（例如，逐个，如连串）单个分子（例如，标签）的通过或分析。

[0152] 本文中使用的“受体”表示识别内源化学信号并对其做出应答的蛋白-分子。当这样的内源化学信号结合受体时，它们造成某种形式的细胞/组织-应答。受体的例子包括、但不限于神经受体、激素受体、营养物受体和细胞表面受体。

[0153] 本文中使用的“间隔物”表示这样的化学部分：其从特异性结合成员伸出可切割基团，或其提供结合成员和支持物之间的链接，或其从光可切割的部分伸出标记/标签。在某些实施方案中，可以在基于多肽或核苷酸的标签或标记的N-端或C-端处包括一个或多个间隔物，以便使所述序列与特异性结合成员具有最佳距离。间隔物可以包括但不限于：6-氨基己酸，6-氨基己酸；1,3-二氨基丙烷；1,3-二氨基乙烷；聚乙二醇(PEG)聚合物基团，1-5个氨基酸的短氨基酸序列，和诸如聚甘氨酸序列。在某些实施方案中，所述间隔物是硝基苄基、二硫代乙基氨基、6碳间隔物、12碳间隔物或3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐。

[0154] 在本文中可互换地使用的“特异性结合配偶体”或“特异性结合成员”表示两种或更多种不同分子中特异性地识别其它分子(相对于其它分子的小的多的识别)。所述两种不同分子中的那种具有在表面上或在内腔中的区域，其特异性地结合其它分子的特定空间和极性组构并因此被定义为后者互补。所述分子可以是特异性结合对的成员。例如，特异性结合成员可以包括、但不限于蛋白，诸如受体、酶和抗体。

[0155] 本文中使用的“标签”或“标签分子”都表示这样的分子(例如，从第二结合成员切割，或从靶分析物解离的适体)：其穿过或横过纳米孔转移，并提供样品中的分析物水平的指示。这些术语表示单标签分子或多个相同标签分子。同样，除非另有说明，否则“标签”表示一个标签或一个或多个标签。

[0156] 本文中使用的“阈值”表示根据经验确定的和主观的截止水平，获得的超过它的数据被视作“信号”，且获得的低于它的数据被视作“噪音”。在图29中描绘了阈值用于数字信号计数的用途。采用基于CUSUM(累加和算法)的计算机程序来处理获得的数据，并基于从用户输入的阈值来检测事件。任何许多事件的检测仅可能避免用户之间的变动，随后为了特定目的此后过滤数据。例如，从该图中可以看出，在设定的阈值以上检测到的事件会影响被计数为信号的事件的群体。对于“松”阈值，较少的事件数目将被计数为信号。对于“紧”阈值，较大的事件数目将被计数为信号。将阈值设定为松或紧是基于测定的期望灵敏度或特异性以及在给定的评估中是否偏好假阳性或假阴性的主观选择。来自DNA转移的当前阻断标记被计算为1.2 nA，其基于将电流变化与DNA的直径和纳米孔膜的厚度相关联的经验公式(H. Kwok, 等人, *PLoS ONE*, 9(3), 392880, 2014)。

[0157] 如本文中使用的，提及的“穿过或横过”纳米孔的运动(例如，纳米颗粒、标签、标签分子或其它对象的运动)可替代地是指，穿过或横过，换言之，从纳米孔的一个侧面至另一个侧面，例如，从顺侧至反侧，或反之亦然。

[0158] 本文中使用的“示踪剂”表示与标签或标记缀合的分析物或分析物片段，其中所述与标签或标记缀合的分析物可以与分析物有效地竞争抗体上对所述分析物特异性的位点。例如，所述示踪剂可以是分析物或分析物的类似物，诸如环孢菌素或它的类似物ISA247、维生素D和它的类似物、性激素和它们的类似物等。

[0159] 本文中使用的“转移事件”表示这样的事件：其中标签穿过或横过(例如，从顺侧至反侧，或反之亦然)层或纳米孔转移。

[0160] 除非另有定义，否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。在冲突的情况下，以本文件(包括定义)为准。下面描述了优选的方法和材料，尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于实践或测试本发明。

本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入以公开和描述引用的出版物与其相关的方法和/或材料。本文中公开的材料、方法和实施例仅仅是示例性的,且无意成为限制性的。

[0161] 2. 用于分析物分析的方法

本文中提供了用于分析物分析的方法。所述方法可能涉及单个分子计数。在某些实施方案中,用于分析物分析的方法可能涉及评估存在于样品中的分析物。在某些实施方案中,所述评估可以用于确定分析物在样品中的存在和/或浓度。在某些实施方案中,所述方法还可以用于确定多种不同分析物在样品中的存在和/或浓度。

[0162] 本文中提供了用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包括与其附接的可切割标签;除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员;切割与第二结合成员附接的标签,所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物;穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述被切割的标签;检测或测量穿过所述层转移的标签;和评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的标签进行评估,其中穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对检测穿过所述层转移的标签进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0163] 本文中提供了用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包括适体;除去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体;解离与所述分析物结合的适体,并穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的适体进行评估,其中穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对检测穿过所述层转移的适体进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0164] 在某些实施方案中,穿过所述层转移的每个标签(诸如适体)是转移事件。测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,通过计数在设定的时间段内转移事件的数目并将所述转移事件的数目与对照关联,可以确定存在于所述样品中的分析物的量。通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目,可以确定标准曲线。在某些实施方案中,通过测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联,可以确定存在于所述样品中的分析物的量。通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间,可以确定标准曲线。在某些实施方案中,通过测量发生

转移事件之间的平均时间并与对照关联,可以确定存在于所述样品中的分析物的量。通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间,可以确定标准曲线。在某些实施方案中,所述对照可以是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准。

[0165] 在示例性情况下,所述方法可以包括:使所述样品与第一结合成员(“结合成员”可替代地被称作“特异性结合成员,”且如下面部分c)中所述)接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;使所述分析物与第二结合成员接触,所述第二结合成员特异性地结合所述分析物且所述第二结合成员包括与其附接的可切割标签(“标签”如本文中定义,且如下面部分d)中所述);除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员;切割与第二结合成员附接的标签,所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物;穿过层中的纳米孔转移所述标签;确定穿过所述层转移的标签的数目;基于穿过所述层转移的标签的数目确定所述样品中分析物的浓度。在某些实施方案中,通过计数每单位时间穿过所述层转移的标签的数目,可以确定所述分析物的浓度。在其它实施方案中,通过确定穿过所述层转移的标签的数目达到阈值时的时间,可以确定所述分析物的浓度。

[0166] 所述样品可以是含有或疑似含有目标分析物的任何测试样品。本文中使用的“分析物”、“靶分析物”、“目标分析物”可互换地使用,且表示在本文公开的方法和装置中测量的分析物。在下面进一步描述了目标分析物。

[0167] 本文中使用的“接触”及其语法等同词表示任何类型的组合动作,其使结合成员与样品中的目标分析物足够近,以致于如果对所述结合成员特异性的目标分析物存在于所述样品中,将发生结合相互作用。接触可以以多种不同的方式实现,包括将所述样品与结合成员组合,通过引入结合成员与分析物紧密靠近而将靶分析物暴露于结合成员,等。

[0168] 在某些情况下,可以将所述第一结合成员固定化在固体支持物上。本文中使用的“固定化”表示所述第一结合成员与固体支持物的表面的稳定结合。“稳定结合”是指两个实体之间的物理结合,其中结合的平均半衰期是一天或更多,例如,在生理条件下。在某些方面,两个实体之间的物理结合在PBS中在4°C具有2天或更多、1周或更多、1个月或更多(包括6个月或更多,例如,1年或更多)的平均半衰期。根据某些实施方案,所述稳定结合源自两个实体之间的共价键、两个实体之间的非共价键(例如,离子键或金属键)或其它形式的化学吸引力,诸如氢键合、范德华力等。

[0169] 具有在其上面固定化了结合试剂的表面的固体支持物可以是呈平面或非平面构象的任何方便表面,诸如微流体芯片的表面、隔室的内表面、珠子(如本文中定义)的外表面或多孔珠子的内表面和/或外表面。例如,所述第一结合成员可以共价地或非共价地附接至珠子,例如,胶乳、琼脂糖、sepharose、抗生蛋白链菌素、甲苯磺酰基活化的、环氧树脂、聚苯乙烯、氨基珠子、胺珠子、羧基珠子等。在某些实施方案中,所述珠子可以是颗粒,例如,微粒。在某些实施方案中,所述微粒可以是约0.1 nm至约10微米,约50 nm至约5微米,约100 nm至约1微米,约0.1 nm至约700 nm,约500 nm至约10微米,约500 nm至约5微米,约500 nm至约3微米,约100 nm至700 nm,或约500 nm至700 nm。例如,所述微粒可以是约4-6微米、约2-3微米或约0.5-1.5微米。小于约500 nm的颗粒有时被视作纳米颗粒。因而,所述微粒任选地可以是约0.1 nm至约500 nm之间、约10 nm至约500 nm之间、约50 nm至约500 nm之间、约100 nm至约500 nm之间、约100 nm、约150 nm、约200 nm、约250 nm、约300 nm、约350 nm、约

400 nm、约450 nm或约500 nm的纳米颗粒。

[0170] 在某些实施方案中,所述珠子可以是磁珠或磁性颗粒。磁性珠子/颗粒可以是铁磁性的、亚铁磁性的、顺磁的、超顺磁的或铁磁流体的。示例性的铁磁性材料包括Fe、Co、Ni、Gd、Dy、CrO₂、MnAs、MnBi、EuO、NiO/Fe。亚铁磁性材料的例子包括NiFe₂O₄、CoFe₂O₄、Fe₃O₄ (或FeO·Fe₂O₃)。珠子可以具有固体核心部分,其为磁性的且被一个或多个非磁性层包围。可替代地,所述磁性部分可以是在非磁性核心周围的层。在其上面固定化了第一结合成员的固体支持物可以以干燥形式或以液体形式储存。在使样品与在其上面固定化了第一结合成员的磁珠接触之前或之后,可以使磁珠处于磁场中。

[0171] 接触步骤以后,可以将样品和第一结合成员温育足够的时间段以允许发生结合成员和分析物之间的结合相互作用。另外,所述温育可以是在促进特异性结合相互作用的结合缓冲液中。通过改变结合缓冲液,可以在测定中操作或改变所述第一结合成员和/或所述第二结合成员的结合亲和力和/或特异性。在某些实施方案中,通过改变结合缓冲液,可以增加所述结合亲和力和/或特异性。在某些实施方案中,通过改变结合缓冲液,可以降低所述结合亲和力和/或特异性。

[0172] 使用下述的公开的方法和装置可以测量所述第一结合成员和/或所述第二结合成员的结合亲和力和/或特异性。在某些实施方案中,使用一组条件测定样品的一个等分试样,并与使用不同组的条件测定的样品的另一个等分试样进行对比,由此确定所述条件对结合亲和力和/或特异性的影响。例如,变化或改变所述条件可以是以下一种或多种:从样品除去靶分析物,加入与靶分析物或配体竞争结合的分子,和改变pH、盐浓度或温度。额外地或可替换地,持续时间可以是可变的,且改变条件可以包括在再次执行检测方法之前等待持续时间。

[0173] 在某些实施方案中,在标签或适体穿过纳米孔装置的孔以后,可以将所述装置重新构造成反转所述标签或适体的运动反向,使得所述标签或适体可以再次穿过所述孔并重新测量或重新检测,例如,在传染性疾病测定上的证实测定中以证实测量的结果。

[0174] 所述结合缓冲液可以包括抗原-抗体结合缓冲液的分子标准,例如,白蛋白(例如,BSA)、非离子型去污剂(吐温-20、Triton X-100)和/或蛋白酶抑制剂(例如,PMSF)。在某些情况下,在加入样品之前或之后,可以将结合缓冲液加入微流体芯片、隔室等中。在某些情况下,在与样品接触之前,所述第一结合成员可以存在于结合缓冲液中。用于发生结合成员和分析物之间的结合相互作用的时间长度可以根据经验确定,且可以取决于结合成员和分析物之间的结合亲和力和结合亲合力。在某些实施方案中,所述接触或温育可以持续5秒至1小时的时间段,例如,10秒至30分钟,或1分钟至15分钟,或5分钟至10分钟,例如,10秒、15秒、30秒、1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时或2小时。结合相互作用的其它条件(例如,温度、盐浓度)也可以根据经验确定,或可以基于生产商的说明书。例如,所述接触可以在室温(21°C-28°C,例如,23°C-25°C)、37°C或4°C进行。在某些实施方案中,在接触步骤过程中可以进行样品与第一结合成员的任选混合。

[0175] 固定化的第一结合成员和分析物之间的复合物形成以后,可以与样品一起从所述第一结合成员附近除去任何未结合的分析物,而第一结合成员和分析物的复合物由于它与固体支持物的结合可以保留。任选地,可以使固体支持物与洗涤缓冲液接触以除去非特异性地结合至固体支持物的任何分子。

[0176] 第一个接触步骤和任选的样品除去和/或任选的洗涤步骤以后,可以使第一结合成员和分析物的复合物与第二结合成员接触,由此导致夹心复合物的形成,其中所述两个结合成员结合所述分析物。第二成员与第一结合成员-分析物复合物的任选混合可以在第二个接触步骤中进行。在某些实施方案中,分析物分子相对于表面的固定化可以辅助任何多余的第二结合成员从溶液中除去,无需担忧从所述表面移去分析物分子。在某些实施方案中,所述第二结合成员可以包括与其附接的标签,诸如可切割标签。

[0177] 如上面所指出的,所述第二个接触步骤可以在对于分析物和第二结合成员之间的结合相互作用而言足够的条件下进行。所述第二个接触步骤以后,可以除去任何未结合的第二结合成员,随后是任选的洗涤步骤。通过合适的方式,例如,微滴驱动、电泳、电润湿、介电泳、静电驱动、电场介导、电极介导、毛细管力、色谱法、离心或抽吸,可以使任何未结合的第二结合成员与第一结合成员-分析物-第二结合成员的复合物分离。从第一结合成员-分析物-第二结合成员的复合物的附近除去任何未结合的第二结合成员后,可以通过合适的方式分离标签,所述标签附接到存在于所述第一结合成员-分析物-第二结合成员的复合物中的第二结合成员。在某些实施方案中,将所述标签从除去未结合的试剂以后剩下的复合物切割或分离。例如,所述标签可以经由可切割的接头(“可切割的接头”如在下面部分f)中所述)附接到所述第二结合成员。可以将第一结合成员-分析物-第二结合成员的复合物暴露于切割剂,所述切割剂介导所述可切割的接头的切割。

[0178] 在某些实施方案中,所述标签从第一结合成员-分析物-第二结合成员复合物的分离在不会导致所述复合物的破坏的条件下实施,从而导致仅所述标签从所述复合物的释放。在其它情况下,所述标签从第一结合成员-分析物-第二结合成员复合物的分离在可能导致所述复合物的破坏的条件下实施,从而导致所述标签、以及所述第二结合成员、所述分析物、所述第一结合成员中的一种或多种从所述复合物的释放。在某些实施方案中,用于计数所述标签的纳米孔的大小可以阻止所述第二结合成员、所述分析物、所述第一结合成员穿过所述纳米孔转移。在其它实施方案中,在第二结合成员、分析物、第一结合成员的复合物保留在固体支持物上的情况下,所述纳米孔可能不具有排除第二结合成员、分析物和第一结合成员的大小。

[0179] 所述分离步骤会导致游离标签的产生,在电场的影响下可以造成所述游离标签穿过或横过纳米孔或纳米孔层(如在下面部分f)中所述)转移。在某些情况下,所述切割步骤可以导致基本上所有的附接到所述第一结合成员-分析物-第二结合成员复合物中的每个第二结合成员的标签分子的分离。标签分子的数目可以与所述复合物中分析物分子的数目相关联,后者与所述样品中分析物的浓度成比例。在某些实施方案中,计数的标签和分析物浓度之间的关联可以是直接的(较高的标签分子数目与较高的分析物浓度有关)。在其中将带标签的竞争物或带标签的分析物(诸如示踪剂(如本文中定义))与样品相组合的实施方案中,所述带标签的竞争物或带标签的分析物会与所述样品中的分析物竞争对第一结合成员的结合,计数的标签和分析物浓度之间的关联可以是相反的(较低的标签分子数目与较高的分析物浓度有关)。标签分子数目和分析物浓度之间的关联(无论是直接的还是相反的)可以是线性的或对数的。因而,穿过纳米孔转移的标签分子的数目可以用于确定样品中的分析物浓度。在某些实施方案中,通过计数每单位时间穿过所述层转移的标签的数目,可以确定所述分析物的浓度。在其它实施方案中,通过确定穿过所述层转移的标签的数目达

到阈值时的时间,可以确定所述分析物的浓度。在某些实施方案中,通过每单位时间在纳米孔处的电流阻断频率,可以确定穿过或横过纳米孔转移的标签分子的数目。在下面的部分g)中进一步描述了信号检测。如在下面的部分d)中所述,所述标签分子可以是纳米颗粒或纳米珠子(“纳米颗粒”和“纳米珠子”如本文中定义)。

[0180] 掺入第二结合成员中的标签的数目(即,标签/第二结合成员缀合物中的标签的数目)会提供与分析物的确定化学计量学。在某些实施方案中,使用产生一致数目的附接到每个第二结合成员的标签的程序,可以将标签附接到第二结合成员。基于计数的速度,可以优化标签的数目。通过在结合成员上包括更多的标签,可以得到较快的读出速率,因为计数速率依赖于浓度。基于标签掺入的化学计量学,例如1:1或1:4掺入比率,可以优化标签的数目。在某些实施方案中,存在1:5掺入比率。例如,一个第二结合成员可以具有与其附接的1个标签分子、2个标签分子、3个标签分子、4个标签分子或多达10个标签分子。在某些实施方案中,一个第二结合成员可以具有与其附接的5个标签分子。已知许多用于将标签缀合至第二结合成员(例如,肽、多肽、核酸)的缀合方法,其中的任一种可以用于制备用在本发明的方法和装置中的带标签的第二结合成员。例如,使用具有C-或N-端六组氨酸标签的抗体、具有醛标签的抗体、无铜点击反应等,使用巯基-马来酰亚胺化学,胺-琥珀酰亚胺基化学,THIOBRIDGE™技术可以完成标签向分析物特异性抗体的位点特异性缀合。

[0181] 在某些实施方案中,所述方法通过确定转移事件的数目可以测量分析物的量。在某些实施方案中,一个或多个转移事件可以对应于结合成员和分析物之间的结合事件,取决于向特异性结合成员中的标签掺入的化学计量学。例如,如果每个结合成员掺入一个标签,那么一个转移事件代表结合成员与分析物的结合;如果每个结合成员掺入两个标签,那么两个转移事件代表结合成员与分析物的结合;如果每个结合成员掺入三个标签,那么三个转移事件代表结合成员与分析物的结合,等。

[0182] 在另一个实施方案中,所述第二结合成员可以是特异性地结合所述分析物的适体。在该实施方案中,标签可以没有附接到适体。相反,随着适体穿过或横过纳米孔转移来计数所述适体,即,所述适体起是第二结合成员和是标签的双重作用。在这些实施方案中,通过任意合适的方法可以使第一结合成员-分析物-适体复合物中的适体从所述复合物解离。例如,在穿过或横过纳米孔转移之前,可以通过变性步骤解离与第一结合成员-分析物的复合物结合的适体。所述变性步骤可能涉及暴露于离液剂、高盐溶液、酸性试剂、碱性试剂、溶剂或加热步骤。然后可以穿过或横过纳米孔转移适体,且穿过或横过纳米孔转移的适体分子的数目可以用于确定样品中分析物的浓度。

[0183] 如本文中指出的,所述标签或适体可以包括核酸。在某些实施方案中,使用纳米孔的计数步骤不包括通过确定存在于所述标签/适体中的核酸序列的至少一部分的身份来确定所述标签或所述适体的身份。例如,所述计数步骤可以不包括确定所述标签/适体的序列。在其它实施方案中,可以不对所述标签/适体测序,但是,可以确定所述标签/适体的身份达到一个标签/适体可以与另一个标签/适体区分开的程度,这基于由它的大小、构象、电荷、电荷量等引起的与标签/适体有关的可区分信号。标签/适体的鉴别在涉及同时分析样品中的多种不同分析物(例如,样品中的2、3、4种或更多种不同分析物)的方法中可能是有用的。

[0184] 在某些实施方案中,使用不同的第一结合成员和第二结合成员中的多个(其中一

对第一结合成员和第二结合成员对样品中的单个分析物是特异性的),可以执行单个样品中的多种分析物的同时分析。在这些实施方案中,与对单个分析物特异性的第一对第一结合成员和第二结合成员的第二结合成员结合的标签可以与下述标签区分开:与对不同分析物特异性的第二对第一结合成员和第二结合成员的第二结合成员结合的标签。如上面所指出的,基于大小、电荷等的差异,第一标签可以与第二标签区分开。

[0185] 在某些实施方案中,可以基本上准确地确定的流体样品中分析物的浓度小于约5000 fM (10^{-15} 摩尔)、小于约3000 fM、小于约2000 fM、小于约1000 fM、小于约500 fM、小于约300 fM、小于约200 fM、小于约100 fM、小于约50 fM、小于约25 fM、小于约10 fM、小于约5 fM、小于约2 fM、小于约1 fM、小于约500 aM (10^{-18} 摩尔)、小于约100 aM、小于约10 aM、小于约5 aM、小于约1 aM、小于约0.1 aM、小于约500 zM (10^{-21} 摩尔)、小于约100 zM、小于约10 zM、小于约5 zM、小于约1 zM、小于约0.1 zM或更小。

[0186] 在某些情况下,检测限度(例如,在溶液中可以确定的分析物的最低浓度)是约100 fM、约50 fM、约25 fM、约10 fM、约5 fM、约2 fM、约1 fM、约500 aM (10^{-18} 摩尔)、约100 aM、约50 aM、约10 aM、约5 aM、约1 aM、约0.1 aM、约500 zM (10^{-21} 摩尔)、约100 zM、约50 zM、约10 zM、约5 zM、约1 zM、约0.1 zM或更小。在某些实施方案中,可以基本上准确地确定的流体样品中分析物的浓度是在约5000 fM至约0.1 fM之间、约3000 fM至约0.1 fM之间、约1000 fM至约0.1 fM之间、约1000 fM至约0.1 zM之间、约100 fM至约1 zM之间、约100 aM至约0.1 zM之间或更小。

[0187] 检测上限(例如,在溶液中可以确定的分析物的较高浓度)是至少约100 fM、至少约1000 fM、至少约10 pM(皮摩尔)、至少约100 pM、至少约100 pM、至少约10 nM(纳摩尔)、至少约100 nM、至少约1000 nM、至少约10 μ M、至少约100 μ M、至少约1000 μ M、至少约10 mM、至少约100 mM、至少约1000 mM或更大。

[0188] 在某些情况下,可以快速地检测分析物在样品中的存在和/或浓度,通常在小于约1小时中,例如,45分钟、30分钟、15分钟、10分钟、5分钟、1分钟或30秒。

[0189] 在某些实施方案中,本文所述的方法的至少一些步骤可以在数字微流体装置上进行,诸如在下面部分3中描述的装置。在某些实施方案中,使用与纳米孔装置结合的数字微流体装置进行本发明的方法。例如,所述数字微流体装置和所述纳米孔装置可以是单独装置,且含有被切割的标签或解离的适体的微滴可以在微流体装置中产生并运输至纳米孔装置。在某些实施方案中,可以将含有被切割的标签或解离的适体的微滴从微流体装置抽吸并使用由用户或机器人操作的移液器运输至纳米孔装置。

[0190] 在某些实施方案中,使用其中数字微流体模块与纳米孔模块集成的装置,诸如下述的装置,实现本发明的方法。在某些实施方案中,所述数字微流体模块和所述纳米孔模块可以可逆地集成。例如,两个模块可以物理地组合以形成集成装置,且所述装置然后可以分离成各个模块。在某些实施方案中,使用一次用弃的筒实现本发明的方法,所述筒包括具有嵌入式纳米孔模块的微流体模块。在下一部分中进一步描述了用于执行本文中提供的方法的装置的示例性实施方案。

[0191] 在某些情况下,与纳米孔模块(可逆地或完全地)集成的装置的微流体装置或微流体模块可以包括以间隔方式布置的第一基底和第二基底,其中所述第一基底与所述第二基底被间隙/空间间隔,且其中至少使所述样品与第一结合成员接触、使所述分析物与第二结

合成员接触、除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员、和切割与第二结合成员(其保持结合至与所述第一结合成员结合的分析物)附接的标签的步骤在所述第一基底和第二基底之间的空间/间隙中实施。

[0192] 本发明的方法的示例性实施方案包括:产生样品的微滴,和将所述样品的微滴与含有第一结合成员的微滴组合以产生单个微滴。所述第一结合成员可以固定化在固体基底例如珠子(例如,磁珠)上。可以将所述单个微滴温育足以允许第一结合成员与存在于样品微滴中的分析物结合的时间。任选地,可以搅拌所述单个微滴以促进样品与第一结合成员的混合。混合可以如下实现:使所述单个微滴前后移动,使所述单个微滴围绕多个电极移动,分裂微滴并然后合并微滴,或使用SAW等。接着,可以使所述单个微滴遭受磁力以将珠子保留在装置中的一个位置,而微滴可以移动离开并用含有第二结合成员的微滴替代。在加入第二结合成员之前,通过使洗涤缓冲液微滴移动至使用磁力将珠子保留在的位置,可以执行一个任选的洗涤步骤。足以使第二结合成员结合与第一结合成员结合的分析物的时间段以后,可以使含有第二结合成员的微滴移动离开,而珠子保留在第一个位置处。可以使用洗涤缓冲液微滴洗涤珠子,随后使所述珠子与含有切割试剂的微滴接触以切割附接到第二结合成员的标签。在其中所述标签经由光可切割的接头附接到第二结合成员的实施方案中,可以将所述珠子暴露于适当波长的光以切割所述接头。在某些情况下,在光可切割的接头的切割之前可以将所述珠子暴露于缓冲液微滴。任选地,在用于除去任何未结合的第二结合成员的洗涤步骤以后,可以留下含有缓冲液微滴覆盖珠子,可以移去将珠子保留在第一个位置的磁力,并可以使含有珠子的缓冲液微滴移动至可以进行光切割的第二个位置。然后将含有被切割的标签的微滴移动至集成装置的纳米孔装置或纳米孔模块部分。在使用适体作为第二结合成员的实施方案中,在用于除去任何未结合的适体的洗涤步骤以后,可以留下含有缓冲液微滴覆盖珠子,可以移去将珠子保留在第一个位置的磁力,并可以使含有珠子的缓冲液微滴移动至可以进行适体解离的第二个位置。在其它实施方案中,在洗涤步骤以后,可以将所述珠子暴露于用于解离与分析物结合的适体的试剂的微滴。可以使含有解离的适体的微滴移动至纳米孔,同时可以使用磁体将珠子保留就位。可以使含有解离的适体的微滴移动至集成装置的纳米孔装置或纳米孔模块部分。

[0193] 在一个替代实施方案中,可以将第一结合成员固定化在所述第一基底或所述第二基底的表面上在所述间隙/空间中的位置处。使样品与第一结合成员接触的步骤可以包括,使所述样品的微滴移动至间隙/空间中固定化第一结合成员的位置。随后的步骤可以与上面关于固定化在磁珠上的第一结合成员描述的那些步骤基本上类似。

[0194] 切割/解离步骤以后,可以将含有被切割的标签/解离的适体的微滴移动至集成装置的纳米孔装置或纳米孔模块。如上面所指出的,使用液体转移系统,诸如移液器,可以移动微滴。在某些情况下,微流体模块可以与纳米孔模块流体连接。流体连接可以如下实现:通过通道将微流体模块连接至纳米孔模块,或可逆地或在集成装置的制造过程中将纳米孔模块放在微流体模块内。在以下部分中进一步描述了这样的装置。

[0195] 在以上实施方案中,任选地,在组合以后,可以操作微滴(例如,前后移动、在圆形方向移动、振荡、分裂/合并、暴露于SAW等)以促进样品与测定试剂(例如,第一结合成员、第二结合成员等)的混合。

[0196] 使用电力(例如,电润湿、介电电泳、电极介导、光诱导电润湿、电场介导和静电

驱动)压力、表面声波等,可以实现微滴在集成的微流体纳米孔装置中的移动。基于装置的细节可以确定用于移动微滴的力,所述细节描述在下面的以下部分a)至g)中,且针对在部分3中描述的特定装置。

[0197] a) 多路复用

所述方法可以包括一种或多种(或可替代地两种或多种)特异性结合成员以在多路复用测定中检测样品中的一种或多种(或可替代地两种或多种)靶分析物。所述一种或多种(或可替代地两种或多种)特异性结合成员中的每一种结合不同的靶分析物,且每种特异性结合成员用不同的标签和/或适体标记。例如,第一特异性结合成员结合第一靶分析物,第二特异性结合成员结合第二靶分析物,第三特异性结合成员结合第三靶分析物,等,且所述第一特异性结合成员用第一标签和/或适体标记,所述第二特异性结合成员用第二标签和/或适体标记,所述第三特异性结合成员用第三标签和/或适体标记,等。在某些实施方案中,第一种条件造成第一标签的切割或释放(如果第一特异性结合成员用标签标记)或第一适体的解离或释放(如果第一特异性结合成员用适体标记),第二种条件造成第二标签的切割或释放(如果第二特异性结合成员用标签标记)或第二适体的解离或释放(如果第二特异性结合成员用适体标记),第三种条件造成第三标签的切割或释放(如果第三特异性结合成员用标签标记)或第三适体的解离或释放(如果第三特异性结合成员用适体标记),等。在某些实施方案中,可以在测定过程中的不同时间改变样品的条件,从而允许检测第一标签或适体、第二标签或适体、第三标签或适体等,由此检测一种或多种(或可替代地两种或多种)靶分析物。在某些实施方案中,基于在纳米孔中的停留时间、电流阻抗的量级或它们的组合,穿过孔同时检测一个种或多种(或可替代地两种或多种)被切割的标签和/或解离的适体。

[0198] b) 示例性的靶分析物

本领域技术人员会明白,使用本发明的方法和装置,可以检测并任选地定量可被第一结合成员和第二结合成员特异性地结合的任何分析物。

[0199] 在某些实施方案中,所述分析物可以是生物分子。生物分子的非限制性例子包括大分子,例如,蛋白、脂类和碳水化合物。在某些情况下,所述分析物可以是激素、抗体、生长因子、细胞因子、酶、受体(例如,神经、激素、营养物和细胞表面受体)或它们的配体、癌症标志物(例如,PSA、TNF- α)、心肌梗塞的标志物(例如,肌钙蛋白、肌酸激酶等)、毒素、药物(例如,成瘾的药物)、代谢剂(例如,包括维生素),等。蛋白分析物的非限制性实施方案包括肽、多肽、蛋白片段、蛋白复合物、融合蛋白、重组蛋白、磷蛋白、糖蛋白、脂蛋白等。

[0200] 在某些实施方案中,所述分析物可以是翻译后修饰的蛋白(例如,磷酸化的、甲基化的、糖基化的蛋白),且所述第一结合成员或所述第二结合成员可以是对翻译后修饰特异性的抗体。经修饰的蛋白可以结合固定化在固体支持物上的第一结合成员,其中所述第一结合成员结合经修饰的蛋白,但是不结合未经修饰的蛋白。在其它实施方案中,所述第一结合成员可以结合未经修饰的和经修饰的蛋白,且所述第二结合成员可以是对翻译后修饰的蛋白特异性的。

[0201] 在某些实施方案中,所述分析物可以是细胞,例如,循环的肿瘤细胞、致病性细菌、病毒(包括逆转录病毒、疱疹病毒、腺病毒、慢病毒、丝状病毒(埃博拉病毒)、肝炎病毒(例如,甲型、乙型、丙型、丁型和戊型);HPV等;孢子等。

[0202] 通过本文呈现的方法可以分析的分析物的一个非限制性列表包括AB42淀粉样蛋

白β-蛋白、胎球蛋白-A、tau、分泌粒蛋白II、朊病毒蛋白、α-突触核蛋白、tau蛋白、神经丝轻链、parkin、PTEN诱导的假定激酶1、DJ-1、富亮氨酸重复序列激酶2、突变的ATP13A2、Apo H、血浆铜蓝蛋白、过氧化物酶体增殖子活化的受体γ共活化剂-1α(PGC-1α)、转甲状腺素蛋白、维生素D-结合蛋白、促细胞凋亡的激酶R(PKR)和它的磷酸化的PKR(pPKR)、CXCL13、IL-12p40、CXCL13、IL-8、Dkk-3(精液)、p14 endocan片段、血清、ACE2、针对CD25的自身抗体、hTERT、CAI25(MUC 16)、VEGF、sIL-2、骨桥蛋白、人附睾蛋白4(HE4)、α-胎蛋白、白蛋白、白蛋白尿、微白蛋白尿、嗜中性粒细胞明胶酶-相关的脂质运载蛋白(NGAL)、白介素18(IL-18)、肾损伤分子-1(KIM-1)、肝脂肪酸结合蛋白(L-FABP)、LMP1、BARF1、IL-8、癌胚抗原(CEA)、BRAF、CCNI、EGFR、FGF19、FRS2、GREB1和LZTS1、α-淀粉酶、癌胚抗原、CA 125、IL8、硫氧还蛋白、β-2微球蛋白水平- 监测病毒的活性、肿瘤坏死因子-α受体- 监测病毒的活性、CA15-3、促卵泡激素(FSH)、黄体化激素(LH)、T-细胞淋巴瘤侵入和转移1(TIAM1)、N-钙粘着蛋白、EC39、双调蛋白、脱氧尿苷三磷酸酶、分泌型凝溶胶蛋白(pGSN)、PSA(前列腺特异性抗原)、胸腺素β15、胰岛素、血浆C-肽、糖基化的血红蛋白(HbA1c)、C-反应蛋白(CRP)、白介素-6(IL-6)、ARHGDI B(Rho GDP-解离抑制剂2)、CFL1(丝切蛋白-1)、PFN1(profilin-1)、GSTP1(谷胱甘肽S-转移酶P)、S100A11(蛋白S100- A11)、PRDX6(过氧化物氧还蛋白-6)、HSPE1(10 kDa热激蛋白、线粒体的)、LYZ(溶菌酶C前体)、GPI(葡萄糖-6-磷酸异构酶)、HIST2H2AA(组蛋白H2A类型2-A)、GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、HSPG2(基膜-特异性的硫酸类肝素蛋白聚糖核心蛋白前体)、LGALS3BP(半乳糖凝集素-3-结合蛋白前体)、CTSD(组织蛋白酶D前体)、APOE(载脂蛋白E前体)、IQGAP1(Ras GTPase-活化样蛋白IQGAP1)、CP(血浆铜蓝蛋白前体)和IGLC2(IGLC1蛋白)、PCDGF/GP88、EGFR、HER2、MUC4、IGF-IR、p27(kip1)、Akt、HER3、HER4、PTEN、PIK3CA、SHIP、Grb2、Gab2、PDK-1(3-磷酸肌醇磷脂依赖性的蛋白激酶-1)、TSC1、TSC2、mTOR、MIG-6(ERBB受体反馈抑制剂1)、S6K、src、KRAS、MEK促分裂原活化蛋白激酶1、cMYC、TOPO II拓扑异构酶(DNA) IIα170 kDa、FRAP1、NRG1、ESR1、ESR2、PGR、CDKN1B、MAP2K1、NEDD4-1、FOXO3A、PPP1R1B、PXN、ELA2、CTNBN1、AR、EPHB2、KLF6、ANXA7、NKX3-1、PITX2、MKI67、PHLPP、脂联素(ADIPOQ)、纤维蛋白原α链(FGA)、瘦素(LEP)、高级糖基化终产物-特异性的受体(AGER aka RAGE)、α-2-HS-糖蛋白(AHSG)、血管生成素(ANG)、CD14分子(CD14)、铁蛋白(FTH1)、胰岛素-样生长因子结合蛋白1(IGFBP1)、白介素2受体、α(IL2RA)、血管细胞粘附分子1(VCAM1)和Von Willebrand因子(VWF)、髓过氧化物酶(MPO)、IL1α、TNFα、核周抗-嗜中性粒细胞胞质抗体(p-ANCA)、乳铁蛋白、钙卫蛋白、威尔曼瘤-1蛋白、水通道蛋白-1、MLL3、AMBIP、VDAC1、大肠杆菌(*E. coli*)肠毒素(热不稳定的外毒素、热稳定的肠毒素)、流感HA抗原、破伤风毒素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、志贺毒素、志贺样毒素I、志贺样毒素II、难辨梭菌(*Clostridium difficile*)毒素A和B等。

[0203] 使用主题方法和装置可以在样品(诸如环境样品、得自有需要的患者或受试者的生物样品)中测量的核酸适体的示例性靶标包括:滥用的药物(例如可卡因)、蛋白生物标志物(包括但不限于,核仁素、核因子-kB必需的调节剂(NEMO)、CD-30、蛋白酪氨酸激酶7(PTK7)、血管内皮生长因子(VEGF)、MUC1糖型、免疫球蛋白μ重链(IGHM)、免疫球蛋白E、αvβ3整联蛋白、α-凝血酶、HIV gp120、NF-κB、E2F转录因子、HER3、纤溶酶原激活物抑制剂、腱糖蛋白C、CXCL12/SDF-1、前列腺特异性的膜抗原(PSMA)、胃癌细胞、HGC-27);细胞(包括但不限于,非小细胞肺癌(NSCLC)、结直肠癌细胞、(DLD-1)、H23肺腺癌细胞、Ramos细胞、T-细胞

急性成淋巴细胞性白血病(T-ALL)细胞、CCRF-CEM、急性髓样白血病(AML)细胞(HL60)、小细胞肺癌(SCLC)细胞、NCIH69、人胶质母细胞瘤细胞、U118-MG、PC-3细胞、过表达HER-2的人乳腺癌细胞、SK-BR-3、胰腺癌细胞系(Mia-PaCa-2);和传染性病原体(包括但不限于,结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、大肠杆菌0157:H7、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)08、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)。

[0204] 使用主题方法和装置可以在得自有需要的患者或受试者的样品中测量的蛋白或肽适体的示例性靶标包括、但不限于:HBV核衣壳蛋白、CDK2、E2F转录因子、胸苷酸合酶、Ras、EB1和高级糖化终产物的受体(RAGE)。适体及其应用和生产方法综述在,例如,Shum等人, J Cancer Ther. 2013 4:872; Zhang等人, Curr Med Chem. 2011;18:4185; Zhu等人, Chem Commun (Camb). 2012 48:10472; Crawford等人, Brief Funct Genomic Proteomic. 2003 2:72; Reverdatto等人, PLoS One. 2013 8:e65180。

[0205] c) 样品

本文中使用的“样品”、测试“测试样品”、“生物样品”表示含有或疑似含有目标分析物的流体样品。所述样品可以源自任意合适的来源。在某些情况下,所述样品可以包含液体、流动的微粒固体、或固体颗粒的流体混悬液。在某些情况下,在本文描述的分析之前可以处理所述样品。例如,所述样品可以在分析之前从它的来源分离或纯化;但是,在某些实施方案中,可以直接测定未处理的含有分析物的样品。分析物分子的来源可以是合成的(例如,在实验室中生产)、环境(例如,空气、土壤、流体样品,例如,水供给等)、动物(例如,哺乳动物)、植物或它们的任意组合。在一个特定实施例中,分析物的来源是人体物质(例如,体液、血液、血清、血浆、尿、唾液、汗液、痰、精液、粘液、泪液、淋巴液、羊水、间隙液、肺灌洗液、脑脊液、粪便、组织、器官等)。组织可以包括、但不限于骨骼肌组织、肝组织、肺组织、肾组织、心肌组织、脑组织、骨髓、子宫颈组织、皮肤等。所述样品可以是液体样品或固体样品的液体提取物。在某些情况下,所述样品的来源可以是器官或组织,诸如活组织检查样品,其可以通过组织崩解/细胞裂解而溶解。

[0206] 可以分析宽范围体积的流体样品。在几个示例性实施方案中,样品体积可以是约0.5 nL、约1 nL、约3 nL、约0.01 μ L、约0.1 μ L、约1 μ L、约5 μ L、约10 μ L、约100 μ L、约1 mL、约5 mL、约10 mL等。在某些情况下,流体样品的体积是在约0.01 μ L至约10 mL之间、约0.01 μ L至约1 mL之间、约0.01 μ L至约100 μ L之间、或约0.1 μ L至约10 μ L之间。

[0207] 在某些情况下,所述流体样品在用于测定中之前可以稀释。例如,在其中分析物分子的来源是人体液(例如,血液、血清)的实施方案中,可以用适当的溶剂(例如,缓冲液诸如PBS缓冲液)稀释所述流体。在使用之前,可以将流体样品稀释约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约10倍、约100倍或更大。

[0208] 在某些情况下,所述样品可以经历分析前处理。分析前处理可以提供另外的功能性诸如非特异性的蛋白除去和/或有效的、仍然可廉价实现的混合功能性。分析前处理的一般方法可以包括使用电动陷阱、AC动电学、表面声波、等速电泳、介电电泳、电泳、或本领域中已知的其它预浓缩技术。在某些情况下,在用于测定中之前可以浓缩流体样品。例如,在其中分析物分子的来源是人体液(例如,血液、血清)的实施方案中,通过沉淀、蒸发、过滤、

离心或它们的组合可以浓缩所述流体。在使用之前,可以将流体样品浓缩约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约10倍、约100倍或更大。

[0209] 在某些实施方案中,在测量分析物之前没有扩增分析物(即,分析物的拷贝数没有增加)。例如,在其中分析物是DNA或RNA的情况下,没有将所述分析物复制以增加所述分析物的拷贝数。在某些情况下,所述分析物是蛋白或小分子。

[0210] d) 特异性结合成员

本领域技术人员会明白,所述结合成员将取决于要分析的分析物。多种靶分子的结合成员是已知的,或可以使用已知技术容易地发现或开发。例如,当靶分析物是蛋白时,结合成员可以包括蛋白,特别是源自骆驼科动物的抗体或其片段(例如,抗原结合片段(Fab)、Fab'片段、F(ab')₂片段、重组抗体、嵌合抗体、单链Fv("scFv")、单链抗体、单结构域抗体,诸如可变重链结构域("VHH";也被称作"VHH片段")(VHH和制备它们的方法描述在Gottlin等人, *Journal of Biomolecular Screening*, 14:77-85 (2009))、重组VHH单结构域抗体和V_{NAR}片段、二硫键连接的Fv("sdFv")和抗-独特型("抗-Id")抗体和以上任一种的功能上有活性的表位结合片段、全长多克隆或单克隆抗体、抗体-样片段等)、其它蛋白,诸如受体蛋白、蛋白A、蛋白C等。在其中分析物是小分子(例如,类固醇、后胆色素类、类视黄醇和脂类)的情况下,所述第一结合成员和/或所述第二结合成员可以是支架蛋白(例如,脂质运载蛋白)或受体。在某些情况下,蛋白分析物的结合成员可以是肽。例如,当靶分析物是酶时,合适的结合成员可以包括酶基底和/或酶抑制剂,其可以是肽、小分子等。在某些情况下,当靶分析物是磷酸化的物质时,所述结合成员可以包含磷酸盐结合剂。例如,所述磷酸盐结合剂可以包含金属离子亲和介质诸如在美国专利号7,070,921和美国专利申请号20060121544中描述的那些。

[0211] 在某些情况下,所述结合成员中的至少一个可以是适体,诸如在美国专利号5,270,163、5,475,096、5,567,588、5,595,877、5,637,459、5,683,867、5,705,337中描述的那些。可以开发核酸适体(例如,单链DNA分子或单链RNA分子)用于捕获基本上任何靶分子。适体以高度特异性的、构象依赖性的方式结合靶分子,通常具有非常高的亲和力,但是也可以选择具有较低结合亲和力的适体。基于非常小的结构差异,诸如甲基或羟基的存在或不存在,适体可以在靶分析物分子之间区分,且某些适体可以在D-和L-对映异构体和非对映异构体之间区分。适体可以结合小分子靶标,包括药物、金属离子和有机染料、肽、生物素和蛋白。适体在生物素化、荧光素标记以后和当附接到玻璃表面和微球时可以保留功能活性。

[0212] 核酸适体是这样的寡核苷酸:其可以是单链寡脱氧核苷酸、寡核糖核苷酸或经修饰的寡脱氧核苷酸或寡核糖核苷酸。“修饰”包括具有共价地修饰的碱基和/或糖的核苷酸。例如,经修饰的核苷酸包括具有糖的核苷酸,所述糖共价地附接到除了在3'位置处的羟基以外且除了在5'位置处的磷酸酯基团以外的低分子量有机基团。因而,经修饰的核苷酸还可以包括2'取代的糖诸如2'-O-甲基-;2-O-烷基;2-O-烯丙基;2'-S-烷基;2'-S-烯丙基;2'-氟-;2'-卤代或2-叠氨基-核糖,碳环糖类似物 α -端基异构糖;差向异构糖诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖和景天庚酮糖。在某些实施方案中,所述结合成员包含含有SEQ ID NO: 1-11中的任一个所示的核苷酸序列的核酸。

[0213] 可以将肽适体设计成干扰蛋白相互作用。肽适体可以是基于在其上面附接可变肽环的蛋白支架,由此限制所述适体的构象。在某些情况下,所述肽适体的支架部分源自细菌

硫氧还蛋白A(TrxA)。

[0214] 当靶分子是碳水化合物时,潜在地合适的捕获组分(如本文中定义)包括,例如,抗体、凝集素和选择素。本领域普通技术人员会明白,可以与目标靶分子特异性地结合的任何分子可以潜在地用作结合成员。

[0215] 对于某些实施方案,合适的靶分析物/结合成员复合物可以包括、但不限于,抗体/抗原、抗原/抗体、受体/配体、配体/受体、蛋白/核酸、酶/基底和/或抑制剂、碳水化合物(包括糖蛋白和糖脂)/凝集素和/或选择素、蛋白/蛋白、蛋白/小分子等。

[0216] 在一个特定实施方案中,所述第一结合成员可以通过链接附接到固体支持物,所述链接可以包含促进结合成员与支持物的附接的、所述支持物和/或结合成员的任何部分、官能化或修饰。结合成员和支持物之间的链接可以包括一个或多个化学或物理(例如,经由范德华力、氢键合、静电相互作用、疏水/亲水相互作用等的非特异性附接)键和/或提供这样的键的化学间隔物。

[0217] 在某些实施方案中,固体支持物还可以包含保护性的、阻断性的或钝化性的层,该层可以消除或减小在测定过程中非捕获组分(例如,分析物分子、结合成员)与结合表面的非特异性附接,所述非特异性附接可能导致检测过程中的假阳性信号或导致信号的损失。在某些实施方案中可以用于形成钝化层的材料的例子包括、但不限于:聚合物,诸如聚乙二醇,其排斥蛋白的非特异性结合;具有该性质的天然存在的蛋白,诸如血清白蛋白和酪蛋白;表面活性剂,例如,两性离子表面活性剂,诸如磺基甜菜碱;天然存在的长链脂类;聚合物刷子,和核酸,诸如鲑鱼精DNA。

[0218] 某些实施方案利用是蛋白或多肽的结合成员。如本领域已知的,可以使用任何数目的技术将多肽附接至多种固体支持物。已知多种将反应性部分添加至蛋白的技术,例如,在美国专利号5,620,850中描述的方法。此外,已知将蛋白附接至表面的方法,例如,参见Heller, Acc. Chem. Res. 23:128 (1990)。

[0219] 如本文中解释的,结合成员和分析物之间的结合是特异性的(例如,当结合成员和分析物是结合对的互补部分时)。在某些实施方案中,所述结合成员特异性地结合所述分析物。“特异性地结合”或“结合特异性”是指,结合成员以足以在分析物分子和测试样品的其它组分或污染物之间区分的特异性结合分析物分子。例如,根据一个实施方案,所述结合成员可以是特异性地结合分析物上的表位的抗体。根据一个实施方案,所述抗体可以是能够特异性地结合目标分析物的任何抗体。例如,适当的抗体包括、但不限于,单克隆抗体、双特异性抗体、微体、结构域抗体(dAb)(例如,诸如在Holt等人(2014) Trends in Biotechnology 21:484-490中所述),且包括单结构域抗体sdAb,其为天然存在的,例如,如在软骨鱼和骆驼科中,或其为合成的,例如,纳米抗体、VHH或其它结构域结构)、合成的抗体(有时被称作抗体模拟物)、嵌合抗体、人源化抗体、抗体融合物(有时被称作“抗体缀合物”)和分别每种的片段。作为另一个实施例,所述分析物分子可以是抗体,且所述第一结合成员可以是抗原且所述第二结合成员可以是特异性地结合靶抗体的第二抗体,或所述第一结合成员可以是特异性地结合靶抗体的第二抗体且所述第二结合成员可以是抗原。

[0220] 在某些实施方案中,所述结合成员可以是化学上程序化的抗体(cpAb)(描述在Rader(2014) Trends in Biotechnology 32:186-197中)、双特异性的cpAb、抗体募集分子(ARM)(描述在McEnaney等人(2012) ACS Chem. Biol. 7:1139-1151)、支化捕获剂诸如

三配体捕获剂(描述在Millward等人(2011) *J. Am. Chem. Soc.* 133:18280-18288)、从非抗体支架衍生出的经工程改造的结合蛋白诸如单抗体(源自人纤连蛋白的第十个纤连蛋白III型结构域)、亲和体(源自免疫球蛋白结合蛋白A)、DARPin (基于锚蛋白重复模块)、anticalins (源自脂质运载蛋白后胆固醇-结合蛋白和人脂质运载蛋白2)和半胱氨酸结肽(knottin) (描述在Gilbreth和Koide, (2012) *Current Opinion in Structural Biology* 22:1-8;Banta等人(2013) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 15:93-113)、WW结构域(描述在Patel等人(2013) *Protein Engineering, Design & Selection* 26(4):307-314)、重新设定目标的受体配体、affitins (描述在Behar等人(2013) 26:267-275)和/或Adhirons (描述在Tiede等人(2014) *Protein Engineering, Design & Selection* 27:145-155)。

[0221] 根据一个其中分析物是生物细胞(例如,哺乳动物、禽类、爬虫类、其它脊椎动物、昆虫、酵母、细菌、细胞等)的实施方案,所述结合成员可以是对细胞表面抗原(例如,细胞表面受体)具有特异性亲和力的配体。在一个实施方案中,所述结合成员可以是粘附分子受体或其部分,其对在靶细胞类型的表面上表达的细胞粘附分子具有结合特异性。在使用中,粘附分子受体与在靶细胞的细胞外表面上的粘附分子结合,由此固定化或捕获所述细胞,然后可以使用第二结合成员检测结合的细胞,所述第二结合成员可以与第一结合成员相同或可以结合在细胞的表面上表达的不同分子。

[0222] 在某些实施方案中,分析物分子和结合成员之间的结合亲和力应当在测定的条件下足以保持结合,所述条件包括用于除去非特异性地结合的分子或颗粒的洗涤步骤。在某些情况下,例如在某些生物分子的检测中,分析物分子与它的互补结合成员的结合常数可以是在至少约 10^4 至约 10^6 M^{-1} 、至少约 10^5 至约 10^9 M^{-1} 、至少约 10^7 至约 10^9 M^{-1} 之间、大于约 10^9 M^{-1} 或更大。

[0223] e) 标签或标记

本文所述的方法可以包括与标签(诸如标记)结合的特异性结合成员,以通过阻抗来分析分析物。掺入的标签或标记不会实质上干扰反应方案的进行。例如,掺入的标签或标记不会干扰分析物和它的互补结合成员之间的结合常数或相互作用。掺入的标签或标记的大小和数目可能与捕获速度和读出速率有关。通过增加掺入的标签或标记的大小和/或数目,可以增加捕获速度和读出速率。例如,掺入的标签或标记的大小和数目可以增加电荷并增加纳米孔的捕获区域。掺入的标签或标记不会改变结合成员动力学(例如,抗体动力学)或反应方案。示例性的标签包括:聚合物,例如,阴离子聚合物或阳离子聚合物(例如,具有净正电荷的多肽,例如,聚组氨酸或聚赖氨酸),其中所述聚合物是约5-1000个残基长度;不与结合成员交叉反应和/或干扰测定的蛋白(例如,球状蛋白),树枝状聚合物,例如,DNA树枝状聚合物;和带电荷的纳米颗粒,例如,纳米珠子。聚合物标签可以包括核酸,例如,脱氧核糖核酸或核糖核酸。聚合物标签可以包括核苷碱基聚合物。在某些情况下,所述标签可以是DNA或RNA适体,其中所述适体不结合所述分析物。在其中所述标签是适体的情况下,它可以任选地在穿过纳米孔转移之前变性。聚合物标签或纳米颗粒(例如,纳米珠子)可以足够大以随着它穿过或横过纳米孔转移而产生可再现的信号。适体可以是20-220个碱基长度,例如,20-60个碱基长。纳米颗粒(例如,纳米珠子或树枝状聚合物)的大小可以在约1 nm至约950 nm直径范围内,例如,10 nm-900 nm、20 nm-800 nm、30 nm-700 nm、50 nm-600 nm、80 nm-500 nm、100 nm-500 nm、200 nm-500 nm、300 nm-500 nm或400 nm-500 nm直径,例如,

10 nm、20 nm、30 nm、50 nm、100 nm、200 nm、300 nm、400 nm、500 nm、600 nm、700 nm、800 nm或900 nm。当用作标签时，纳米颗粒的优选大小是可以穿过或横过纳米孔的大小（如在本文中进一步描述的）。在某些情况下，所述纳米珠子/纳米颗粒可以由具有净负或正电荷的材料制成，或可以处理成具有净负或正电荷。示例性的纳米珠子/纳米颗粒包括由有机或无机聚合物制成的那些。有机聚合物包括聚合物例如聚苯乙烯、碳、聚丙烯酰胺等。无机聚合物包括硅或金属纳米珠子/纳米颗粒。在某些情况下，所述纳米珠子/纳米颗粒可以不是磁性的。

[0224] 在某些情况下，所述标签可以是单链DNA或RNA。单链DNA或RNA可以在穿过或横过纳米孔转移之前与探针分子杂交。在某些情况下，所述方法可以包括分析单个样品中的多种分析物。结合样品中的不同分析物的第二结合成员可以包括与其附接的不同单链DNA或RNA作为标签，且所述不同单链DNA或RNA可以与不同探针杂交，所述不同探针随着它们穿过纳米孔将不同单链DNA或RNA进一步彼此区分开。在其它实施方案中，附接到不同第二结合成员的标签可以具有当所述标签穿过或横过纳米孔时可区分的不同发夹结构（例如，发夹结构的长度）。在另一个实施方案中，附接到不同第二结合成员的标签可以具有当所述标签穿过或横过纳米孔时可区分的不同长度——例如，所述标签可以是不同长度（例如，25碱基对、50碱基对、75碱基对、100碱基对、150碱基对、200碱基对或更多）的双链DNA。在某些情况下，附接到不同第二结合成员的标签可以具有不同的聚乙二醇（PEG）长度，或可以是用PEG差别地修饰的DNA或RNA。

[0225] 应当指出，对标签或标签分子的提及包括单个标签或单标签分子以及多个标签（其全部可以是相同的）。还应当指出，所述纳米孔包括存在于单个层（例如，基底、膜等）中的单个纳米孔以及多个纳米孔。这样，计数穿过或横过层/片/膜中的纳米孔转移的标签的数目表示计数穿过或横过层/片/膜中的一个或多个纳米孔转移的多个标签。纳米孔可以存在于单个层（诸如基底或膜）中，所述层可以由电绝缘的或具有高电阻的任意合适材料制成，诸如脂双层，电介质材料，例如，氮化硅和二氧化硅，原子级薄膜诸如石墨烯、硅、硅烯、二硫化钼（MoS₂）等，或它们的组合。

[0226] 所述标签可以是任意大小或形状。在某些实施方案中，所述标签可以是约10至950 nm直径的纳米颗粒或纳米珠子，例如，20-900 nm、30-800 nm、40-700 nm、50-600 nm、60-500 nm、70-400 nm、80-300 nm、90-200 nm、100-150 nm、200-600 nm、400-500 nm、2-10 nm、2-4 nm或3-4 nm直径。所述标签可以是基本上球形的，例如球形珠子或纳米珠子，或半球形的。所述标签可以是约0.5 kDa至约50 kDa大小的蛋白，例如，约0.5 kDa至约400 kDa、约0.8 kDa至约400 kDa、约1.0 kDa至约400 kDa、约1.5 kDa至约400 kDa、约2.0 kDa至约400 kDa、约5 kDa至约400 kDa、约10 kDa至约400 kDa、约50 kDa至约400 kDa、约100 kDa至约400 kDa、约150 kDa至约400 kDa、约200 kDa至约400 kDa、约250 kDa至约400 kDa、约300 kDa至约400 kDa、约0.5 kDa至约300 kDa、约0.8 kDa至约300 kDa、约1.0 kDa至约300 kDa、约1.5 kDa至约300 kDa、约2.0 kDa至约300 kDa、约5 kDa至约300 kDa、约10 kDa至约300 kDa、约50 kDa至约300 kDa、约100 kDa至约300 kDa、约150 kDa至约300 kDa、约200 kDa至约300 kDa、约250 kDa至约300 kDa、约0.5 kDa至约250 kDa、约0.8 kDa至约250 kDa、约1.0 kDa至约250 kDa、约1.5 kDa至约250 kDa、约2.0 kDa至约250 kDa in size、约5 kDa至约250 kDa、约10 kDa至约250 kDa、约50 kDa至约250 kDa、约100 kDa至约250

kDa、约150 kDa至约250 kDa、约200 kDa至约250 kDa、约0.5 kDa至约200 kDa、约0.8 kDa至约200 kDa、约1.0 kDa至约200 kDa、约1.5 kDa至约200 kDa、约2.0 kDa至约200 kDa in size、约5 kDa至约200 kDa、约10 kDa至约200 kDa、约50 kDa至约200 kDa、约100 kDa至约200 kDa、约150 kDa至约200 kDa、约0.5 kDa至约100 kDa、约0.8 kDa至约100 kDa、约1.0 kDa至约100 kDa、约1.5 kDa至约100 kDa、约2.0 kDa至约100 kDa、约5 kDa至约100 kDa、约10 kDa至约100 kDa、约50 kDa至约100 kDa、约0.5 kDa至约50 kDa、约0.8 kDa至约50 kDa、约1.0 kDa至约50 kDa、约1.5 kDa至约50 kDa、约2.0 kDa至约50 kDa、约5 kDa至约50 kDa、约10 kDa至约50 kDa. 约10 kDa至约90 kDa、约10 kDa至约80 kDa、约10 kDa至约70 kDa、约10 kDa至约60 kDa、约20 kDa至约90 kDa、约20 kDa至约80 kDa、约20 kDa至约70 kDa、约20 kDa至约60 kDa、约40 kDa至约90 kDa、约40 kDa至约80 kDa、约40 kDa至约70 kDa或约40 kDa至约60 kDa。

[0227] 在某些实施方案中,所述标签可以是纳米颗粒。如本文中指出的,所述纳米颗粒可以可逆地(例如,可切割地)附接到第二结合成员。在某些方面,所述纳米颗粒可以是确定直径的纳米珠子,所述确定直径可以通过纳米孔层测量的纳米珠子的性质。在某些情况下,本发明的方法、系统和装置可以用于同时分析样品中的多种不同分析物。对于这样的分析,可以使用各自特异性地结合相应分析物的多种第二结合成员。所述不同第二结合成员中的每一种可以附接到不同大小的纳米珠子,所述纳米珠子可以用于鉴别所述第二结合成员。例如,所述不同纳米珠子标签可以具有不同直径,例如,1 nm、2 nm、4 nm、6nm、8 nm、10 nm、12 nm、14 nm或larger,诸如up-20 nm、30 nm、50 nm、100 nm、200 nm、300 nm、400 nm、500 nm、600 nm、700 nm、800 nm、900 nm或990 nm。

[0228] 在某些实施方案中,不同直径的纳米珠子可以都穿过具有单一直径的纳米孔的纳米孔层转移,其中基于在纳米孔中的停留时间、电流阻抗的量级或它们的组合可以鉴别不同大小的纳米珠子。在某些情况下,含有多个纳米孔层(其中第一层可以具有第一直径的纳米孔,且第二层可以具有第二直径的纳米孔)的堆叠纳米孔层装置可以用于检测和计数穿过或横过纳米孔转移的纳米珠子。所述多个纳米孔层可以以特定方式布置,所述特定方式使得具有较大直径的纳米孔的层位于具有较小直径的纳米孔的层的上游。在US20120080361中公开了示例性的堆叠纳米孔层。

[0229] 可以在本发明的方法中用作标签的示例性纳米颗粒包括在5 nm-950 nm直径范围内的金纳米颗粒或聚苯乙烯纳米颗粒。

[0230] 在某些情况下,所述标签可以是聚合物,例如,核酸。通过检测标签特有的信号,诸如与聚合物标签的大小或长度有关的信号,可以确定标签的存在。通过测量它在孔或通道中的停留时间,例如,通过测量电流的短暂阻断的持续时间,可以确定聚合物标签的大小或长度。

[0231] 可以是标签或标记的部分、全部、与标签或标记结合、或附接到标签或标记的元件包括:纳米颗粒;金颗粒;银颗粒;银、铜、锌或其它金属涂层或沉着物;聚合物;拖拉标签(如本文中定义);磁性颗粒;可浮颗粒;金属颗粒;带电荷的部分;介电电泳标签,具有和没有杂质的二氧化硅(例如,石英、玻璃等);聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA);聚酰亚胺;氮化硅;金;银;量子点(包括CdS量子点);碳点;荧光团;猝灭剂;聚合物;聚苯乙烯;Janus颗粒;散射颗粒;荧光颗粒;磷光颗粒;球体;立方体;绝缘体;导体;标有条形码的或带标记的颗粒;多孔颗

粒;固体颗粒;纳米壳;纳米棒;微球;分析物诸如病毒、细胞、寄生虫和生物体;核酸;蛋白;分子识别元件;间隔物;PEG;树枝状聚合物;电荷改变剂;磁性材料;酶;DNA,包括适体序列;可扩增的DNA;重复的DNA序列;可检测元件与分子识别元件(例如,工程改造的结合成员)的融合物或缀合物;抗-抗体适体;针对抗体结合蛋白的适体;吸收的或吸附的可检测的化合物;血红素;荧光素;磷光体;叠氮基或炔炔(例如,末端或非末端炔炔)或其它点击化学参与物。

[0232] 在某些实施方案中,可以选择标签以提供足够高以实现样品的快速分析的捕获速率。在某些实施方案中,所述标签的捕获速率可以是约1个事件/10秒、1个事件/5秒、1个事件/秒或更高。在某些实施方案中,可以使用直链聚合物标签,例如,核糖聚合物、脱氧核糖聚合物、寡核苷酸、DNA或RNA。通常,对于1 nM的DNA溶液,使用固态纳米孔(Si_3N_4)、零盐梯度、200–800 mV的电压和1 M的盐(KCl)浓度,捕获速率是大约1个事件/秒。

[0233] 在某些情况下,不可以使用直链聚合物标签(例如,核糖聚合物、脱氧核糖聚合物、寡核苷酸、DNA或RNA),因为这些标签的捕获速率对于某些应用而言可能太低。具有半球形、球形或基本上球形形状的标志会穿过纳米孔快速地转移,且因而缩短在需要较快标志计数的应用中可以使用的测定持续时间。在某些情况下,基于测定所需的捕获速率,可以选择球形或半球形标志的大小。例如,对于较高的捕获速率,可以选择较大尺寸的球形或半球形标志。在某些情况下,所述标志可以是球形标志,例如,在相同测量条件下,具有比直链标志(例如,DNA标志)的捕获速率快约10倍、30倍、50倍、100倍、300倍、500倍或1000倍的捕获速率的纳米颗粒/纳米珠子。

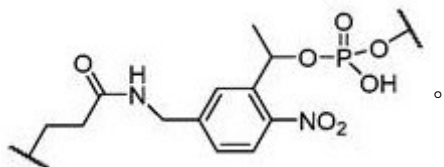
[0234] 在某些实施方案中,所述标志可以缀合至抗体,例如,CPSP抗体缀合物。在某些实施方案中,所述标志可以缀合至具有间隔物的抗体,例如,具有间隔物的CPSP抗体缀合物。在某些实施方案中,所述标志可以缀合至寡核苷酸和抗体,例如,CPSP寡核苷酸-抗体缀合物。在某些实施方案中,所述标志可以缀合至具有间隔物的寡核苷酸和抗体,例如,具有间隔物的CPSP寡核苷酸-抗体缀合物。在某些实施方案中,所述标志可以缀合至寡核苷酸,例如,CPSP寡核苷酸缀合物。在某些实施方案中,所述间隔物包括硝基苄基、二硫代乙基氨基、6碳间隔物、12碳间隔物或3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐。在某些实施方案中,所述间隔物包含硝基苄基,且所述标志是DNA分子。在某些实施方案中,所述间隔物是二硫代乙基氨基,且所述标志是羧基化的纳米颗粒。在某些实施方案中,所述间隔物是3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐,且所述标志是寡核苷酸。在某些实施方案中,所述间隔物包含6碳间隔物或12碳间隔物,且所述标志是生物素。

[0235] f) 可切割的接头

在本文所述的方法中使用的标志可以通过通用接头附接到特异性结合成员。可切割的接头会确保所述标志可以被除去。所述通用接头可以是可切割的接头。例如,所述标志可以通过可切割的接头附接到第二结合成员。可以使第一结合成员-分析物-第二结合成员的复合物暴露于介导可切割的接头的切割的切割剂。所述接头可以通过任意合适的方法进行切割,所述方法包括暴露于酸、碱、亲核体、亲电体、残基、金属、还原剂或氧化剂、光、温度、酶等。合适的接头可以从标准的化学阻断基团改进,如在Greene & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons中公开的。在Guillier等人(Chem.

Rev. 100:2092-2157, 2000) 中公开了在固相合成中使用的其它合适的可切割接头。所述接头可以是酸可切割的、碱可切割的或光可切割的。氧化还原反应可以是切割方案的组成部分。可切割的接头可以是带电荷的聚合物。

[0236] 所述接头可以是光可切割的接头、化学可切割的接头或热可切割的接头。在实施方案中,所述接头可以是热敏感的可切割的接头。在所述接头是光可切割基团的情况下,所述切割剂可以是破坏或切割光可切割基团的适当波长的光。在许多实施方案中,用于切割光可切割的连接基团的光的波长范围为约180 nm至400 nm,例如,约250 nm至400 nm,或约300 nm至400 nm。优选的是,活化切割所需的光不会影响分析物的其它组分。合适的接头包括基于0-硝基苄基化合物和硝基藜芦基化合物的那些。还可以使用基于安息香化学的接头(Lee等人, J. Org. Chem. 64:3454-3460, 1999)。在某些实施方案中,所述光可切割的接头可以源自下述部分:



[0237] 可替换地,在切割接头是化学可切割的基团的情况下,所述切割剂可以是能够切割所述基团的化学试剂。通过基于氧化/还原的切割、酸催化的切割、碱催化的切割或亲核置换,可以切割化学可切割的接头。例如,在连接基团是二硫键的情况下,可以使用巯基介导的切割用二硫苏糖醇或 β -巯基乙醇释放所述标签。在其中连接基团是限制位点的再其它实施方案中,所述试剂是催化剂,诸如酶,所述酶可以是水解酶、限制性酶或另一种切割连接基团的酶。例如,所述限制性酶可以是I型、II型、IIS型、III型和IV型限制性酶。

[0238] 在某些实施方案中,所述切割接头是酶可切割序列。在本文任意实施方案的一个方面,酶可切割序列是2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸长度的核酸序列。在一个实施方案中,所述酶可切割序列包含至少10个核苷酸的序列。在一个实施方案中,所述酶可切割序列包含2-20个核苷酸之间的序列。在一个实施方案中,所述酶可切割序列包含2-15个核苷酸之间的序列。在一个实施方案中,所述酶可切割序列包含4-10个核苷酸之间的序列。在一个实施方案中,所述酶可切割序列包含4-15个核苷酸之间的序列。

[0239] 例如,所述可切割的接头可以是吡啶鎓,醚诸如被取代的苄基醚或其衍生物(例如,苄基羟基(hydryl)醚、茛满基醚等)(其可以被酸性或温和还原条件切割(例如,过氧化氢,以产生吡啶酮和磺酰胺)),使用P-消除产生的带电荷的聚合物(其中弱碱可以用于释放产物),缩醛,包括其硫代类似物(其中分离通过弱酸实现,特别是在有捕获羰基化合物存在下),光不稳定的键(例如,0-硝基苯甲酰基、7-硝基茛满基、2-硝基二苯甲基醚或酯等),或肽接头,对其进行酶水解(例如,酶可切割的接头),特别是在所述酶识别特定序列的情况下,诸如针对因子Xa的肽或肠激酶。接头的例子包括、但不限于二硫键接头、酸不稳定的接头(包括二烷氧基苄基接头)、Sieber接头、吡啶接头、叔丁基Sieber接头、亲电子地可切割的接头、亲核地可切割的接头、光可切割的接头、在还原条件、氧化条件下切割、通过使用安全捕获接头进行的切割和通过消除机制进行的切割。

[0240] 亲电子地切割的接头通常由质子切割,且包括对酸敏感的切割。合适的接头包括经修饰的苄基系统诸如三苯甲基、对烷氧基苄基酯和对烷氧基苄基酰胺。其它合适的接头

包括叔丁氧基羰基 (Boc) 基团和缩醛系统。为了制备合适的接头分子,还可以考虑亲硫金属 (诸如镍、银或汞) 在硫代缩醛或其它含硫保护基的切割中的应用。

[0241] 对于亲核切割,可以使用基团诸如在水中不稳定的酯 (即,可以简单地在碱性pH切割) 和对非水性亲核体不稳定的基团。可以使用氟离子来切割基团诸如三异丙基硅烷 (TIPS) 或叔丁基二甲基硅烷 (TBDMS) 中的硅-氧键。

[0242] 对还原切割敏感的接头可以与诸如二硫键还原一起使用。使用基于钯的催化剂的催化氢化已经用于切割苄基和苄氧基羰基。

[0243] 基于氧化的方案是本领域众所周知的。这些包括对烷氧基苄基的氧化以及硫和硒接头的氧化。还可以使用用于切割二硫键和其它基于硫或硒的接头的碘水溶液。

[0244] 安全捕获接头是分两步切割的那些接头。在一个优选的系统中,第一步是产生反应性的亲核中心,随后是第二步,其包括导致切割的分子内环化。例如,可以用肼或光化学处理乙酰丙酸酯键以释放活性胺,后者然后可以环化以切割分子中别处的酯 (Burgess等人, *J. Org. Chem.* 62:5165-5168, 1997)。

[0245] 还可以使用消除反应。例如,可以使用基团诸如Fmoc和氰基乙基的基于碱的消除以及烯丙型系统的钯催化的还原消除。

[0246] 在所述接头是热可切割的接头或热敏感的接头的情况下,所述切割剂可以是在阈值以上的局部温度升高以破坏或切割所述热可切割的基团。在某些实施方案中,可以使用微波辐射在局部区域中升高温度以诱导颗粒过热。可以使用颗粒过热方法,诸如在Dutz和Hergt (*Nanotechnology*, 25:452001 (2014)) 中综述的和在美国专利号7,718,445、美国专利公开号20030082633、国际专利公开号WO 2002029076和美国专利公开号20020197645中描述的那些,它们每篇通过引用并入本文。在某些实施方案中,通过将能量从光转移至吸收靶标 (诸如染料、颜料或水),可以光热地实现温度升高。在一个方面,光的来源是激光。在某些实施方案中,所述升高的温度可以造成双链DNA的热分离。

[0247] g) 纳米孔层

在本发明中,检测和/或计数所述标签 (例如,聚合物、适体、纳米颗粒) 可以通过穿过或横过纳米孔或纳米通道转移所述标签来完成。在某些实施方案中,检测和/或计数所述标签 (例如,聚合物、适体、纳米颗粒) 可以通过穿过或横过至少一个或多个纳米孔或纳米通道转移所述标签来完成。在某些实施方案中,至少一个或多个纳米孔或纳米通道并联或串联存在。在某些实施方案中,所述纳米孔或纳米通道的大小适合一次转移不超过一个标签。因而,在某些实施方案中,所述纳米孔的大小通常依赖于要检查的标签的大小。具有双链区域的标签可以要求比足够完全单链的标签的转移的那些更大的纳米孔大小。另外,纳米颗粒标签诸如纳米珠子标签可以要求比寡聚体标签更大的孔或通道。通常,约1 nm直径的孔可以允许单链聚合物的通过,而2 nm直径或更大的孔尺寸将允许双链核酸分子的通过。在某些实施方案中,所述纳米孔或纳米通道是针对单链标签可选择的 (例如,约1 nm至小于2 nm直径),而在其它实施方案中,所述纳米孔或纳米通道具有足够的直径以允许双链多核苷酸的通过 (例如,2 nm或更大)。选择的孔径会提供目标分析物的最佳信噪比。

[0248] 在某些实施方案中,所述孔可以是约0.1 nm至约1000 nm直径,约50 nm至约1000 nm,约100 nm至1000 nm,约0.1 nm至约700 nm,约50 nm至约700 nm,约100 nm至700 nm,约0.1 nm至约500 nm,约50 nm至约500 nm,或约100 nm至500 nm。例如,所述孔可以是约0.1

nm、约0.2 nm、约0.3 nm、约0.4 nm、约0.5 nm、约0.6 nm、约0.7 nm、约0.8 nm、约0.9 nm、约1.0 nm、约1.5 nm、约2.0 nm、约2.5 nm、约3.0 nm、约3.5 nm、约4.0 nm、约4.5 nm、约5.0 nm、约7.5 nm、约10 nm、约15 nm、约20 nm、约25 nm、约30 nm、约35 nm、约40 nm、约45 nm、约50 nm、约55 nm、约60 nm、约65 nm、约70 nm、约75 nm、约80 nm、约85 nm、约90 nm、约95 nm、约100 nm、约150 nm、约200 nm、约250 nm、约300 nm、约350 nm、约400 nm、约450 nm、约500 nm、约550 nm、约600 nm、约650 nm、约700 nm、约750 nm、约800 nm、约850 nm、约900 nm、约950 nm或约1000 nm直径。

[0249] 一般而言,纳米孔的长度短于纳米通道。纳米通道比纳米孔长得多,且因而在希望增加分子穿过它转移所需的时间(相对于穿过或横过相同直径的纳米孔转移所需的时间)的应用中是有用的。纳米孔的长度可以在约0.1 nm至小于约200 nm的范围内。纳米通道的长度可以在约500 nm至约100 μm 的范围内或更长。纳米孔和纳米通道的直径可以是类似的。

[0250] 多种类型的纳米孔可以用于分析所述标签/适体。这些尤其包括采用嵌入膜中的生物孔或通道的生物纳米孔。另一类纳米孔层是固态纳米孔,其中所述通道或孔完全地或部分地由制造的或雕刻的固态组分(诸如硅)制成。在某些实施方案中,所述纳米孔是使用受控的介质击穿产生的固态纳米孔。在某些实施方案中,所述纳米孔是通过受控的介质击穿以外的方法产生的固态纳米孔。

[0251] 在某些实施方案中,纳米孔的长度可以是多达约200 nm,例如,约0.1 nm至约30 nm、约10至约80 nm、约1至约50 nm、约0.1 nm至约0.5 nm、约0.3 nm至约1 nm、约1 nm至约2 nm、约0.3 nm至约10 nm或约10至约30 nm。纳米孔层中纳米孔的数目可以是约1、2、3、4、5、10、30、100、300、1000、3000、10000、30000、100000、300000或更多。层中的纳米孔之间中心至中心的距离可以是约100 nm至约300 nm、约300 nm至约500 nm、约500 nm至约1000 nm,例如,100 nm、150 nm、200 nm或300 nm。

[0252] 在某些实施方案中,多个纳米孔层(每个含有一个或多个纳米孔)可以彼此串联布置,用于检测和/或计数所述标签(例如,聚合物、适体、纳米颗粒)。在该情况下,检测和/或计数所述标签可以通过穿过或横过每个纳米孔层转移所述标签来实现。这样,计数穿过或横过层/片/膜中的纳米孔转移的标签的数目表示,计数穿过或横过一个或多个层/片/膜中的一个或多个纳米孔转移的多个标签。在某些实施方案中,当存在超过一个纳米孔层时(例如,1、2、3、4、5、6个或其它数目的纳米孔层,只要技术上可行),它们任选地串联存在,其中在一个层中的至少一个纳米孔与另一个层中的另一个纳米孔分离或堆叠在另一个层中的另一个纳米孔上(例如,在上方或在顶上),等。在所述纳米孔层串联的情况下,可以使用至少两个电极来建立电场以驱动标签穿过孔,且任选地,位于纳米孔层之间的另外电极可以进一步提供驱动电流。

[0253] i) 生物孔

为了检测并任选地计数标签/适体,可以使用具有允许标签转移的通道尺寸的任何生物孔。两大类生物通道适合用于本文中公开的方法。非电压门控的通道允许分子穿过孔通过,不需要膜电位的变换来活化或打开通道。另一方面,电压门控的通道需要特定范围的膜电位来活化通道开口。使用生物纳米孔的大多数研究已经使用 α -溶血素,即在金黄色葡萄球菌中发现的一种约10 nm长度的蘑菇形同型寡聚七聚体通道。每个亚基贡献两条 β 链以形

成14链反向平行的 β 筒。由 β 筒结构形成的孔具有大约2.6 nm直径的入口,其含有赖氨酸残基环并向具有约3.6 nm直径的内腔中开放。溶血素孔(其穿透脂双层)的主干具有约2.0 nm的平均内径,在孔隙和主干之间具有1.5 nm收缩。所述主干的尺寸足够单链核酸通过,但是不够双链核酸通过。因而,可以使用 α -溶血素孔作为对单链多核苷酸和类似尺寸的其它聚合物选择性的纳米孔。

[0254] 在其它实施方案中,所述生物纳米孔具有足够比单链核酸更大的聚合物通过的尺寸。一种示例性的孔是线粒体膜孔蛋白,即一种位于线粒体外膜中的电压依赖性阴离子通道(VDAC)。膜孔蛋白可以以经纯化的形式得到,且当重构进人工脂双层中时,会产生能够允许双链核酸通过的功能通道(Szabo等人, 1998, FASEB J. 12:495-502)。结构研究提示,膜孔蛋白还具有含13或16条链的 β -筒型结构(Rauch等人, 1994, Biochem Biophys Res Comm 200:908-915)。膜孔蛋白表现出与由 α -溶血素、麦芽糖孔蛋白(LamB)和短杆菌肽形成的孔的电导相比更大的电导。膜孔蛋白支持研究较大电导性能表明,膜孔蛋白通道具有足够双链核酸通过的尺寸。据估计膜孔蛋白分子的孔直径是4 nm。据估计解螺旋的双链核酸的直径是约2 nm。

[0255] 可能适合用于扫描双链多核苷酸的另一种生物通道是在枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)中发现的通道(Szabo等人, 1997, J. Biol. Chem. 272:25275-25282)。由枯草芽孢杆菌制成并掺入人工膜中的质膜囊泡允许双链DNA的跨膜通过。由枯草芽孢杆菌膜制品形成的通道的电导类似于线粒体膜孔蛋白的电导。尽管存在这些通道的不完全表征(例如,经纯化的形式),为了本文中的目的不是必须具有经纯化的形式。稀释质膜制品(通过溶解在适当的去污剂中或掺入足够表面积的人工脂质膜中)可以在检测设备中分离单个通道。通过适当地计时的洗涤限制膜制品(或蛋白制品)与人工膜的接触的持续时间,会提供用于将单个通道掺入人工脂双层中的另一种方法。可以使用电导性能来表征掺入双层中的通道。

[0256] 在某些情况下,所述纳米孔可以是杂合纳米孔,其中将生物孔引入固态纳米孔中,例如,在非生物材料中制造的纳米孔。例如,可以将 α -溶血素孔插入固态纳米孔中。在某些情况下,所述纳米孔可以是在Hall等人, Nature Nanotechnology, 2010年11月28日, 第5卷, 第874-877页中描述的杂合纳米孔。

[0257] ii) 固态孔

在其它实施方案中,通过穿过或横过由非生物材料制造的纳米孔或纳米通道转移标签,进行标签的分析。可以使用许多不同的技术从多种固态材料制造纳米孔或纳米通道,所述技术尤其包括化学沉积、电化学沉积、电镀、电子束雕刻、离子束雕刻、纳米光刻(nanolithography)、化学蚀刻、激光消融、聚焦离子束、原子层沉积和本领域众所周知的其它方法(参见,例如,Li等人, 2001, Nature 412:166-169;和WO 2004/085609)。

[0258] 在特定实施方案中,所述纳米孔可以是在WO13167952A1或WO13167955A1中描述的纳米孔。如在WO13167952A1或WO13167955A1中所述,通过精确地扩大在膜中形成的纳米孔,可以形成具有准确且均匀孔径的纳米孔。所述方法可能包括:通过跨纳米孔施加高电势来扩大纳米孔;测量穿过所述纳米孔流动的电流;部分地基于测量的电流确定所述纳米孔的大小;和当所述纳米孔的大小对应于希望的大小时,除去施加于所述纳米孔的电势。在某些情况下,施加的电势可能具有在高值和低值之间振荡的脉冲波形,可以在将电势以低值施

加于纳米孔的同时测量穿过纳米孔流动的电流。

[0259] 作为示例且不作为限制, 固态材料包括任何已知的半导体材料、绝缘材料和用绝缘材料包被的金属。因而, 所述纳米孔的至少部分可以包含、但不限于硅、二氧化硅、硅烯、氧化硅、石墨烯、氮化硅、锗、砷化镓或金属、金属氧化物和用绝缘材料包被的金属胶体。

[0260] 为了制备纳米大小的孔, 可以在制造过程中采用多种反馈程序。在离子穿过孔的实施方案中, 检测穿过固态材料的离子流会提供测量在制造过程中产生的孔径的方式(参见, 例如, 美国公开的申请号2005/0126905)。在电极限定孔大小的其它实施方案中, 在电极之间的电子隧穿电流会给出关于电极之间的间隙的信息。隧穿电流的增加指示电极之间间隙空间的减小。技术人员会明白其它反馈技术。

[0261] 在某些实施方案中, 使用离子束雕刻来制造纳米孔, 如在Li等人, 2003, Nature材料s 2:611-615中所述。在某些实施方案中, 使用高电流来制造纳米孔, 如在W013167952A1或W013167955A1中所述。在其它实施方案中, 通过电子束光刻和高能电子束雕刻的组合来制造纳米孔(参见, 例如, Storm等人, 2003, Nature材料s 2:537-540)。通过离子束溅射技术来产生合适纳米孔的类似方案描述在Heng等人, 2004, Biophy J 87:2905-2911中。使用与生产超薄膜的一般技术组合的用聚焦高能电子束在金属氧化物半导体(CMOS)上的光刻, 形成纳米孔。在其它实施方案中, 通过氮化硅的雕刻, 如在美国专利号6,627,067、6,464,842、6,783,643和美国公开号2005/0006224中提供的, 构建纳米孔。

[0262] 在某些实施方案中, 可以将纳米通道构建为金或银纳米管。使用多孔材料的模板(诸如使用轨道蚀刻方法制备的聚碳酸酯过滤器)形成这些纳米通道, 并将金或其它合适的金属沉积在多孔材料的表面上。轨道蚀刻的聚碳酸酯膜通常如下形成: 将固体膜材料暴露于高能核颗粒, 这会在膜材料中建立轨道。然后采用化学蚀刻以将蚀刻的轨道转化成孔。形成的孔具有约10 nm和更大的直径。调节核颗粒的强度会控制在膜中形成的孔的密度。通过经由无电电镀方法(Menon等人, 1995, Anal Chem 67:1920-1928)将金属(通常金或银)沉积在轨道蚀刻的孔中, 在蚀刻的膜上形成纳米管。该金属沉积方法使用沉积在孔材料表面上的催化剂, 然后将其浸入含有Au(I)和还原剂的溶液中。Au(I)至金属Au的还原发生在含有催化剂的表面上。沉积的金依赖于温育时间, 使得增加温育时间会减小过滤材料中的孔的内径。因而, 通过调节沉积在孔上的金属的量, 可以控制孔径。使用多种技术测量得到的孔大小, 例如, 使用简单扩散的气体运输性能, 或通过使用膜片箱型系统测量穿过孔的离子流。支持材料保持完整或被除去以剩下金纳米管。根据需要, 无电电镀技术能够形成小于约1 nm至约5 nm直径或更大的孔径。具有约0.6 nm的孔直径的金纳米管似乎会区分Ru(bpy)₂+2和甲基紫精, 从而表现出金纳米孔的选择性(Jirage等人, 1997, Science 278:655-658)。通过将含有巯基的化合物附接至金表面或通过用其它官能团衍生化金表面, 容易地完成金纳米管表面的修饰。该特征允许如本文中讨论的孔修饰化合物以及探测标记的附接。装置(诸如用于本文所述生物孔的顺/反设备)可以与金纳米孔一起使用来分析单个编码的分子。

[0263] 在检测标签的模式涉及穿过所述标签的电流(例如, 电子隧穿电流)的情况下, 可以通过多种技术将固态膜金属化。可以将导电层沉积在膜的两侧上以产生适合用于沿着链的长度查询标签的电极, 例如, 纵向电子隧穿电流。在其它实施方案中, 可以将导电层沉积在膜的一个表面上以形成适合用于查询横过孔的标签(例如, 横向隧穿电流)的电极。多种

用于沉积导电材料的方法是已知的,包括,溅射沉积(即,物理气相沉积)、非电解质沉积(例如,胶体混悬液)和电解质沉积。其它金属沉积技术是纤丝蒸发、金属层蒸发、电子束蒸发、闪蒸和诱导蒸发,且是技术人员会明白的。

[0264] 在某些实施方案中,通过溅射沉积来形成检测电极,其中离子束轰击金属块并蒸发金属原子,然后使金属原子以薄膜形式沉积在晶片材料上。取决于使用的光刻方法,然后将金属薄膜借助于反应性离子蚀刻进行蚀刻或使用化学-机械抛光进行抛光。可以将金属薄膜沉积在预形成的纳米孔上或在所述孔的制造之前沉积。

[0265] 在某些实施方案中,通过电沉积来制造检测电极(参见,例如,Xiang等人, 2005, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:1265-1268;Li等人, *Applied Physics Lett.* 77(24):3995-3997;和美国公开申请号2003/0141189)。该制造过程适合用于产生纳米孔和位于固态膜的一个面上的对应检测电极,诸如用于检测横向电子隧穿。最初,使用常规光刻方法来在二氧化硅层(其支持在硅晶片上)上形成一对面对电极。电解质溶液覆盖所述电极,并通过使电流穿过电极对来将金属离子沉积在所述电极之一上。金属随时间在电极上的沉积会减小电极之间的间隙距离,不仅建立检测电极,而且建立纳米大小的间隙用于转移编码的分子。可以通过许多反馈方法控制电极之间的间隙距离。

[0266] 在检测是基于电荷诱导的场效应的成像的情况下,可以如在美国专利号6,413,792和美国公开的申请号2003/0211502中所述制造半导体。制造这些纳米孔装置的方法可以使用与用于制造其它固态纳米孔的那些技术类似的技术。

[0267] 如下面进一步描述的,进行所述标签(诸如多核苷酸)的检测。为了分析标签,可以以多种形式构造纳米孔。在某些实施方案中,所述装置包含生物膜或固态膜,所述膜含有被保持在两个蓄池(也被称作顺和反隔室)之间的纳米孔(参见,例如,美国专利号6,627,067)。用于两个隔室之间的电子迁移的导管允许两个隔室的电接触,且在两个隔室之间的电压偏置会驱动所述标签穿过纳米孔的转移。该构型的一种变体被用于分析穿过纳米孔的电流,如在美国专利号6,015,714和6,428,959和Kasianowicz等人, 1996, *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13770-13773中所述,它们的公开内容通过引用并入本文。

[0268] 以上装置的变体公开在美国申请公开号2003/0141189中。一对通过电沉积制造的纳米电极位于基底表面上。所述电极彼此面对且具有足够单个核酸通过的间隙距离。绝缘材料保护所述纳米电极,仅暴露纳米电极的尖部用于检测核酸。绝缘材料和纳米电极分离充当样品蓄池的隔室和通过转移向其递送聚合物的隔室。阴极和阳极电极提供电泳电场用于将标签从样品隔室驱动至递送隔室。

[0269] 通过施加穿过纳米孔定向的电场,可以产生用于驱动标签穿过纳米孔的电流偏置。在某些实施方案中,所述电场是恒定电压或恒定电流偏置。在其它实施方案中,通过电泳电场参数的脉冲操作来控制所述标签的运动(参见,例如,美国专利申请号2003/141189和美国专利号6,627,067)。电流的脉冲可以提供在确定的时间段内精确地穿过孔转移寡核苷酸标签的一个或仅几个碱基并短暂地将所述标签保留在孔内并由此提供所述标签的电性能的更大分辨力的方法。

[0270] 所述纳米孔装置还可以包含用于在寡核苷酸标签穿过纳米孔时限制其取向的电场或电磁场。该保持场可以用于减少寡核苷酸标签在孔内的运动。在某些实施方案中,提供与转移的方向垂直的电场来限制标签分子在纳米孔内的运动。通过使用在样品板上表面和下

面的两个平行导电板,在美国申请公开号2003/0141189中对此进行了解释。这些电极会产生与标签分子的转移方向垂直的电场,并因而将标签分子保留至样品板之一。DNA的带负电荷的主链或被修饰成在一条链上具有负电荷的核酸将在阳极板上定向,由此限制标签分子的运动。

[0271] 在其它实施方案中,通过在美国申请公开号2004/0149580中描述的方法控制标签的位置,所述方法采用通过位于纳米孔附近或表面上的一系列电极在孔中建立的电磁场。在这些实施方案中,一组电极施加直流电压和射频电势,而第二组电极施加相反直流电压和射频电势,其相对于由第一组电极产生的射频电势发生180度相移。该射频四极将带电荷的颗粒(例如,核酸)保持在场中心(即,孔中心)。

[0272] 在示例性的实施方案中,所述纳米孔膜可以是导电层和电介质层的多层堆叠,其中嵌入的导电层或导电层闸门在纳米孔中和周围提供良好受控的且可测量的电场,所述标签穿过所述纳米孔转移。在一个方面,所述导电层可以是石墨烯。在例如US20080187915和US20140174927中找到堆叠的纳米孔膜的例子。

[0273] 应当理解,所述纳米孔可以位于膜、层或其它基底中,所述术语已经可互换地用于描述包含纳米孔的二维基底。

[0274] 在某些实施方案中,可以形成纳米孔作为使用所述纳米孔检测和/或确定分析物浓度的测定过程的部分。具体地,可以首先提供用于使用纳米孔检测和/或确定分析物浓度的装置,其没有在膜或层中形成的纳米孔。所述装置可以包括膜,所述膜分隔在所述膜的相对侧面上的两个隔室(顺和反隔室)。所述顺和反隔室可以包括盐溶液,且可以连接至电源。当要在膜中建立纳米孔时,将电压施加于所述顺和反隔室中的盐溶液,并测量穿过所述膜的电导。在建立纳米孔之前,不存在或存在微小的跨膜测量的电流。在建立纳米孔之后,跨膜测量的电流增加。可以施加电压足以建立期望直径的纳米孔的时间量。在建立纳米孔之后,可以使分析物或标签穿过纳米孔转移并检测转移事件。在某些实施方案中,可以将相同的盐溶液用于纳米孔建立以及用于检测分析物或标签穿过纳米孔的转移。任意合适的盐溶液可以用于纳米孔建立和/或分析物或标签穿过纳米孔的转移。可以使用不会损伤计数标记的任何盐溶液。示例性的盐溶液包括氯化锂、氯化钾、氯化钠、氯化钙、氯化镁等。可以基于盐溶液的期望电导率来选择盐溶液的浓度。在某些实施方案中,所述盐溶液可以具有1mM至10 M范围内的浓度,例如,10 mM-10 M、30 mM-10 M、100 mM-10 M、1 M-10 M、10 mM-5 M、10 mM-3 M、10 mM-1 M、30 mM-5 M、30 mM-3 M、30 mM-1 M、100 mM-5 M、100 mM-3 M、100 mM-1 M、500 mM-5 M、500 mM-3 M或500 mM-1 M,例如,10 mM、30 mM、100 mM、500 mM、1 M、3 M、5 M或10 M。

[0275] 在某些实施方案中,所述纳米孔可能变得堵塞,并通过调节电极跨纳米孔层或膜施加的电压的模式来清洁被堵塞的纳米孔。在某些情况下,通过反转跨纳米孔层或膜的电压的极性来清洁被堵塞的纳米孔。在某些情况下,通过增加跨纳米孔层或膜施加的电压的量级来清洁被堵塞的纳米孔。电压的增加可以是短暂增加,持续10秒(s)或更小,例如,8 s或更小、6 s或更小、5 s或更小、4 s或更小、3 s或更小、2 s或更小、1 s或更小、0.5 s或更小、0.4 s或更小、0.3 s或更小、0.2 s或更小,包括0.1 s或更小。

[0276] h) 信号检测

通过穿过或横过纳米孔转移查询标签/适体并检测可检测的性质会产生可以用于计数

(即,确定量或浓度)和/或鉴别(即,确定存在)所述标签/适体的信号。采用的检测方法的类型可能对应于针对所述标签检测的性质。

[0277] 在某些实施方案中,所述可检测的性质是随着所述标签穿过孔转移所述标签对纳米孔的电性质的影响。纳米孔的电性质尤其包括电流振幅、阻抗、持续时间和频率。在某些情况下,通过使用纳米孔力光谱法(参见例如,Tropini C.和Marziali A., *Biophysical Journal*, 2007, 第92卷, 1632-1637),可以鉴别标签。用于检测孔的电性质的装置可以包括掺入层(例如,薄膜或膜)中的纳米孔,其中所述薄膜或膜分隔由导电桥连接的顺隔室和反隔室。要分析的标签可以存在于纳米孔的顺侧上在通常包含一种或多种溶解盐(诸如氯化钾)的水溶液中。使用位于纳米孔的顺和反侧的电极跨孔施加电场会造成标签穿过纳米孔的转移,这会影响离子穿过孔的迁移,由此改变孔的电性质。可以在合适的时间频率测量电流以得到足够的数据点来检测电流信号模式。然后将产生的信号模式与一组参比模式进行对比,其中每种参比模式得自具有已知分析物浓度的样品中与分析物结合的已知标签的单一群体的检查。如以前指出的,可以计数每单位时间穿过纳米孔转移的相同类型的标签的数目,例如,每15 min、13 min、10 min、8 min、6 min、4 min、2 min、1min、30秒、每20秒、每15秒、每10秒、每5秒、每1秒、每100毫秒、每10毫秒或每1毫秒穿过或横过纳米孔转移的相同类型的标签的数目。在某些情况下,可以针对某个时间段计数穿过纳米孔转移的相同类型的标签的数目,以确定达到阈值计数的时间量。电流振幅、电流持续时间、电流频率和电流量级的转换可以限定标签的信号模式,并且可以用于将不同标签彼此区分开。纳米孔的电流性能的测量(诸如通过膜片箝技术)描述在上面讨论的出版物和多种参考文献中,例如,Hille, B, 2001, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 第3版, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.在一个时间段内测量的计数的数目(计数/时间)与穿过或横过纳米孔转移的分子(例如,标签)的浓度成比例。通过产生标准曲线可以确定标签的浓度。例如,可以使一系列不同浓度的标准分子穿过纳米孔转移并测量计数/时间以计算每种浓度的计数速率。将正在测量的标签的计数速率与标准曲线进行对比以计算标签的浓度。

[0278] 在某些实施方案中,所述标签的可检测的性质可以是电子的量子隧穿。量子隧穿是通过颗粒的量子波性质跃迁穿过经典禁止能量状态的量子力学效应。在由于供体和受体之间的电子运动而存在势垒的情况下发生电子隧穿。为检测电子隧穿,可以将微型电极尖端定位在离样本约2纳米处。在适当的分离距离,电子隧穿在所述尖部和所述样品之间的区域,且如果在所述尖部和所述样品之间施加电压,净电子电流(即,隧穿电流)在电压偏置的方向流动穿过所述间隙。在纳米装置使用检测电极用于测量隧穿电流的情况下,所述电极位于转移标签附近,使得在检测电极和标签之间存在电子隧穿。如下面进一步讨论的,电极相对于转移标签的布置可能决定穿过所述标签发生的电子运输的类型。

[0279] 在某些实施方案中,所述标签的分析可能涉及检测穿过核酸链(即,沿着核酸链纵向地)发生的电流(Murphy等人, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91(12):5315-9)。电子转移的确切机制是未知的,尽管给出电子隧穿作为DNA的运输性质的一种解释。但是,穿过双链核酸的电子运输的根本物理学对于本文中的目的而言不是限制,并且穿过所述核酸流动的电流的检测用于将一种聚合物标签与另一种聚合物标签区分开。为了检测穿过标签分子链纵向发生的电子流,可以在标签分子转移方向纵向地定位检测电极,使得在与延伸的

标签分子的链平行的电极之间存在间隙。在不同的实施方案中,所述检测电极可以放在分隔纳米孔的两侧的层(例如,膜)的相对侧,而在其它实施方案中,所述检测电极可以定位在分隔纳米孔的两侧的层内。

[0280] 核酸中的电子流的另一种模式是横过核酸发生的那种,例如,在延伸的核酸链的横向方向(例如,跨双链核酸的直径)。在双链核酸中,电子运输可以通过成对的碱基发生,而在单链核酸中,电子运输可以通过单个未成对的碱基发生。此外,化学组成、水合结构、与带电荷的离子的相互作用、每个碱基的空间取向和不同碱基配对组合的差异可能改变横向电子运输特征,并从而提供区分在序列和/或聚合物主链方面不同的标签分子的基础。为了检测横过标签分子(即,在延伸的核酸链的横向)的电子流,将检测电极定位在纳米孔的一个侧面上以查询横过纳米孔而不是穿过纳米孔的标签分子。

[0281] 在纵向或横向检测的实施方案中,电极的厚度可以决定所述电极查询的碱基的总数。对于横向检测,检测电极的尖部可以被设定成具有查询单个核苷碱基(如本文中定义)的大小,且由此得到单碱基分辨率。在其它实施方案中,将检测电极的尺寸布置成查询超过一个核苷碱基。因而,在某些实施方案中,在任何一次查询的核苷碱基的数目可以是约2个或更多、约5个或更多、约10个或更多或约20个或更多,取决于检测标签分子的不同聚合物序列中的差异所需的分辨率。

[0282] 在其它实施方案中,可以将标签结构的差异检测为电容的差异。在US2003/0141189中解释了这类测量。电容会造成在确定的施加的频率和阻抗时施加的交流电压的相移。为已知序列和结构的核酸确定每个核苷碱基的相移特征,并用作用于鉴别各个碱基特征的参比标准。最近邻分析可以允许延伸至超过单个核苷碱基的电容测量。

[0283] 在其它实施方案中,所述检测技术可以是基于成像电荷诱导场,如在美国专利号6,413,792和美国公开的申请号2003/0211502中所述,它们的公开内容通过引用并入本文。为了基于电荷诱导场检测标签,使用上述的半导体装置。如果电流通道在半导体中形成,源区和漏区之间的电压施加会产生从源区至漏区的电流流动。因为每个核苷碱基具有有关的电荷,标签分子穿过半导体孔的通过会诱导衬在所述孔里面的半导体材料的电导率的变化,由此诱导特定量级和波形的电流。因为碱基的电荷、电荷分布和大小的差异,不同碱基产生不同量级和波形的电流。在美国专利号6,413,792公开的实施方案中,所述聚合物穿过由p-型硅层形成的孔。如上所述,通过与用于穿过其它类型的通道移动聚合物的那些方法类似的方法,实现标签分子的转移。预期电流的量级是在微安培范围的量级,其比通过电子隧穿检测到的预期微微安培电流高得多。因为所述标签分子中的聚合物段区域包含超过单个核苷碱基,这些嵌段共聚物区域将产生反映嵌段共聚物区域的电荷和电荷分布的特征性信号。

[0284] 应当理解,尽管上面的描述涉及各种检测技术,但是在某些实施方案中,可以使用多种不同的技术来检查单标签分子(参见,例如,Kassies等人,2005, J Microsc 217:109-16)。多种检测模式的例子尤其包括与电子隧穿电流组合的电流阻断,和与成像电荷诱导场组合的电流阻断。使用不同检测模式的并行检测可以用于通过关联不同检测模式之间所得到的信号的检测时间来鉴别标签分子。

[0285] 在某些实施方案中,测量穿过所述层转移的标签的数目或检测穿过所述层转移的标签包括,观察所述标签对纳米孔的电流阻断效应。在某些实施方案中,当电流阻断效应高

于阈值水平时,分析物存在于样品中。

[0286] 3. 用于分析物分析的装置

本发明描述了与纳米孔装置结合使用的微流体装置和集成的微流体纳米孔装置。公开的与纳米孔装置结合使用的微流体装置和集成的微流体纳米孔装置可以用在如上所述的分析物分析方法中。但是,在某些情况下,本文中所述的装置可以用于其它应用。同样地,在某些情况下,本文所述的方法可以与其它装置一起使用。

[0287] 在图1A和1B中描绘了与纳米孔装置结合使用的微流体装置。与要在纳米孔装置15中分析的流体微滴11一起描绘了微流体装置10。所述流体微滴可以包括要使用所述纳米孔装置计数的标签(例如,被切割的标签或适体)。所述纳米孔装置15包括第一隔室16、具有纳米孔18的层17、和第二隔室19。图1A和1B描绘了液体转移步骤1,其中将流体微滴11从微流体装置10取出并放在纳米孔装置15中。如在图1A中描绘的,将流体微滴11以特定方式放在层17上面,所述方式导致所述微滴横过层17分开并定位在纳米孔18处。可以经由进入端口(未显示)将流体微滴引入纳米孔装置15中。所述进入端口可以定位在层17的部分上面。例如,所述进入端口可以位于含有纳米孔的层所在的隔室的壁内的开口中。在图1B中,将液体微滴11放在第一隔室16中。缓冲液添加步骤2将缓冲液引入第二隔室19中。在其它实施方案中,在将液体微滴11引入第一隔室16中之前,可以将缓冲液加入第二隔室19。在其它实施方案中,在将缓冲液加入第一隔室16中之前或之后,可以将液体微滴11放在第二隔室19中。在图1A中,不需要将缓冲液加入任一个隔室的步骤。

[0288] 在另一个实施方案中,所述装置可以是集成装置。所述集成装置可以包括微流体模块和纳米孔模块,它们可以单独构建并然后组合以形成集成装置,或所述微流体模块和所述纳米孔模块可以在单个装置中嵌入在一起。

[0289] 图2A和2B描绘了具有与纳米孔模块组合的微流体模块的集成装置的示意图,且所述两个模块通过使用通道连接它们而集成。尽管图2A和2B描绘了包括各个模块(它们组合以产生集成装置)的装置,但是应当理解,图2A和2B的装置还可以制造为其中连接两个模块的单元装置。

[0290] 在图2A和2B的顶图中,描绘了具有要在纳米孔装置30中分析的流体微滴25的微流体模块20。纳米孔模块30包括第一隔室31、具有纳米孔33的层32、和第二隔室34。微流体模块20经由通道40与纳米孔模块30集成。所述通道流体地连接所述两个模块并促进微滴25从微流体模块20向纳米孔模块30的运动。中图解释了微滴25经由通道40从微流体模块20向纳米孔模块30的运动。如在图2A中所示,所述通道可以将微流体模块20连接至纳米孔模块30中的进入端口。可以将进入端口(未显示)定位,使得流体微滴25以特定方式放在层32上面,所述方式导致所述微滴横过层32分开并定位在纳米孔33处。在转移过程结束时,所述流体微滴横过纳米孔33定位(图2A,底图)。在其它实施方案中,通道40可以将微流体模块20连接至纳米孔模块30的第一或第二隔室中的进入端口。这样的一个实施方案显示在图2B中,其中通道40将微流体模块20连接至纳米孔模块30的第一隔室31中的进入端口。在将液体微滴25转移进第一隔室31中之后或之前,可以将缓冲液加入第二隔室。在图2B的步骤2中,在将微滴25转移至第一隔室31之后,将缓冲液加入第二隔室34中。任选地,在转移结束之后,可以除去通道40并分离两个模块。分别在图1A、1B、2A和2B中显示的微流体和纳米孔装置和模块各自是单独有功能的。

[0291] 图2C-2H描绘了包括数字微流体模块50和纳米孔模块60的集成装置的一个实施方案。与电极阵列49一起描绘了数字微流体模块,所述电极阵列49可操作地连接至多个试剂蓄池51,所述试剂蓄池51用于产生要运输至所述纳米孔模块的微滴。所述蓄池51中的一个或多个可以含有试剂或样品。不同的试剂可以存在于不同的蓄池中。在微流体模块50中还描绘了将电极阵列49连接至电源(未显示)的接触垫53。没有描绘将电极阵列49连接至接触垫的痕迹线。所述电极阵列49将一个或多个微滴(诸如缓冲液微滴或含有缓冲液和/或标签(例如,被切割的标签或解离的适体)的微滴)运输至位于数字微流体模块50和纳米孔模块60之间的接口100处的转移电极71和72中的一个或两个。数字微流体模块50和纳米孔模块60可操作地连接在接口100处。纳米孔模块60包括至少两个微流体毛细管通道61和62,它们在设置纳米孔层70的位置处彼此相交。两个微流体毛细管通道61和62位于纳米孔模块内的两个不同基底中(描绘在图2D中)。因而,所述纳米孔模块包括第一基底63(例如,底基底),其包括在第一基底63的顶表面中的微流体毛细管通道61,且还包括第二基底64(例如,顶基底),其具有在所述第二基底的第一表面中的微流体毛细管通道62。第二基底64覆盖微流体毛细管通道61,且第一基底63铺在微流体毛细管通道62下面。在纳米孔层70的位置处在两个通道的相交点处,毛细管通道62覆盖毛细管通道61(也参见图2D,底图)。所述两个毛细管通道在相交处被放在所述相交处的纳米孔层70物理上分离。纳米孔层70包括至少一个定位于毛细管通道的相交处的纳米孔(未显示),并允许分子从一个毛细管通道穿过所述纳米孔运输至其它毛细管通道。毛细管通道61和62在所述毛细管通道的第一末端处在接口100处开放,且在所述毛细管通道的第二末端处开放至蓄池/排出口(84和85,如在图2C中所见)。在图2C中还描绘了定位在电极阵列49上面的覆盖基底101。覆盖基底101限定微流体模块中的间隙,在其中操作微滴。覆盖基底101可以任选地包括设置在覆盖基底101的底表面上的电极55(例如,参比电极),从而提供双平面电极构型用于操纵微流体模块50中的微滴。在没有双平面电极构型存在下,通过使用共面电极驱动,例如使用电极阵列49或另一种共面电极构型,可以在微流体模块50中操纵微滴。例如,在US6911132中描述的共面电极可以用于操纵微流体模块50中的微滴。

[0292] 图2D顶图显示了接口100的横截面的前视图的示意图,在所述接口100处可操作地连接数字微流体模块50和纳米孔模块60。在图2D的底图中描绘了所述装置在转移电极72处的横截面的侧视图的示意图。图2D顶图显示了定位在两个转移电极71和72上的两个微滴(65a和65b),所述两个转移电极71和72位于微流体模块50和纳米孔模块60之间的接口100处。如在图2D顶图中所示,定位在电极71处的微滴65a与毛细管通道61中的开口对齐,而定位在电极72处的微滴65b与毛细管通道62中的开口对齐。图2D底图解释了集成装置的横截面的侧视图,显示了微滴65b在转移电极72上的布置。将微滴65b定位成移动进毛细管通道62。还显示了毛细管通道61;但是,所述毛细管通道离转移电极72一小段距离且与转移电极71对齐(未显示)。还描绘了覆盖基底101,其具有设置在覆盖基底101的底表面上的电极55。在图2D-2H描绘的集成装置的实施方案中,将纳米孔模块与微流体模块的电极阵列设置在相同基底上。

[0293] 转移电极的顶表面和通向毛细管通道的入口之间的垂直距离可以取决于形成微流体模块和纳米孔模块的较低部分的基底的厚度。基于要转移至纳米孔模块的微滴的体积,可以设定垂直距离。通过改变基底的厚度,可以调节垂直距离。例如,纳米孔模块的基底

(例如,基底63)可以保持相对薄,或可以增加在其上面设置转移电极的基底的厚度(例如通过使用更厚的基底)以确保所述微滴与毛细管通道的入口对齐。在图2E中描绘了一种示例性装置,其中通过使用具有较厚底基底的微流体模块使微滴与通向毛细管通道的入口对齐。在图2E中显示的装置具有与关于图2C-2D所述相同的构型。但是,在其上面定位电极阵列的基底59a的厚度相对于在其上面设置纳米孔模块的基底部分的厚度增加。图2E顶图描绘了在微流体模块和纳米孔模块之间的接口100处的横断面的前视图。图2E底图描绘了在转移电极72和毛细管通道62的位置处的横断面的侧视图。如在图2E中所示,在其上面设置电极阵列49和转移电极71和72的基底59a比在其上面设置纳米孔模块的基底59b更厚。如在图2E底图中所示,基底59a具有第一高度H1,而基底59b具有第二高度H2,其中H1大于H2。基底59a和59b之间的高度差异导致纳米孔模块中的毛细管通道61和62分别与定位在电极71和72上的微滴的对齐。在图2E的底图中还描绘了通道61。如从图2C可见,毛细管通道62在纳米孔层70的位置处与毛细管通道61垂直。通道61与转移电极71对齐且被构造成接收定位在转移电极71上的微滴65a。尽管将两个毛细管通道描绘成在相交点处彼此垂直,但是也预见到其它构型,其中所述两个通道在90度以外的角度相交。

[0294] 在与毛细管通道接触后,所述微滴经由任意合适的方式(例如,毛细管作用)移动进毛细管通道。通过另外的方法/材料可以促进微滴向毛细管通道中的运动。例如,所述微滴可以通过扩散、布朗运动、对流、泵送、施加的压力、重力驱动的流动、密度梯度、温度梯度、化学梯度、压力梯度(正或负)、气动压力、产生气体的化学反应、留心流动、毛细管压力、芯吸、电场介导、电极介导、电泳、介电泳、磁迁移、磁场、磁力驱动的流动、光学力、趋化性、趋光性、表面张力梯度驱动的流动、Marangoni应力、热-毛细管对流、表面能梯度、声迁移、表面声波、电渗流、热迁移、电润湿、光诱导电润湿或其组合移动进毛细管通道中。另外或可替换地,可以如下促进微滴向毛细管通道中的运动:使用例如驱动力,诸如本文公开的那些;在毛细管中使用亲水涂层;改变毛细管通道的大小(例如宽度和/或高度和/或直径和/或长度)。

[0295] 在图2C-2H描绘的实施方案中,至少部分地通过改变毛细管的横截面来控制横过毛细管通道61和62的流体的流动——所述流体最初相对迅速地移动,直到它进入毛细管的更狭窄部分。一个或两个微滴可以是用于通过纳米孔分析的、含有要检测或计数的分析物(或被切割的标签或解离的适体)或导电溶液(例如,不含有分析物的缓冲液)的微滴。在某些情况下,一个微滴65a可以是含有分析物/标签/适体的微滴,而其它微滴65b可以是缓冲液微滴。尽管为每个通道描绘了单个微滴,但是在实践中,可以将多个微滴运输至纳米孔模块。例如,可以将多个微滴以相继方式运输至纳米孔模块。在某些情况下,可以将多个微滴收集在一个或两个转移电极处以产生运输至纳米孔模块的较大微滴。

[0296] 图2F解释了在集成装置中使用的各种电极的示例性构型。如上面所指出的,单个连续电极55(在图2F中未显示)以从电极阵列49间隔方式定位在微流体模块60中。所述电极阵列包括一系列可单独控制的电极。电极55设置在覆盖基底101的较低表面上。电极55和电极阵列使微滴向转移电极移动。尽管描绘了电极55没有覆盖转移电极71和72,在某些示例性装置中,覆盖基底101和电极55可以延伸到转移电极上面。在其中电极55没有覆盖转移电极的实施方案中,可以使用共平面电极使微滴向转移电极移动(例如,如在US6911132中所述的共面驱动)。如本文中所述,单个电极55可以充当参比或接地电极,而电极阵列49可以

是可单独控制的(例如,所述电极阵列可以是可独立地驱动的驱动电极)。电极对:对80a和80b和对90a和90b定位在纳米孔模块中。使用电极对80a、80b和90a、90b建立跨纳米孔层70的相反极性用于驱动带电荷的分子穿过纳米孔层70中的纳米孔。在某些实施方案中,电极对80a和80b可以是正电极,且电极对90a和90b可以是负电极。图2G解释了纳米孔模块的替代电极构型,其中使用两个电极80和90(而不是四个)来建立跨纳米孔层70的极性差异。这些实施例证实了对称(四个电极)或不对称(两个电极)电极构型的应用,其产生跨纳米孔层的电势梯度用于穿过纳米孔转移带电荷的分子。

[0297] 图2H解释了毛细管通道的替代构型,其中仅一个通道61在接口100处连接至微流体模块。其它通道62连接至两个蓄池,所述蓄池可以填充导电液体以促进带电荷的分子横过纳米孔的转移。

[0298] 在某些情况下,通过在第一基底的顶表面的第一区域上形成数字微流体模块部分的蓄池和电极阵列,可以制造本文提供的集成装置。通过在第二基底的底表面上设置单个电极(例如,电极55)可以制备第二基底,并以间隔方式定位在可单独控制的电极的阵列上面以提供单个电极和电极阵列之间的面对取向用于双平面微滴驱动。本文中使用的“微滴驱动”表示使用本文公开的微流体装置或使用在US6,911,132、US6,773,566或US6,565,727(它们的公开内容通过引用并入本文)中公开的微滴驱动器对微滴的操作。因而,本文公开的装置的双平面电极或电极阵列的构型可以类似于在US6,911,132、US6,773,566或US6,565,727中公开的那些。在第二基底上的电极55也可以被称作参比电极。在微流体模块中的电极可以任选地用电介质材料包被。还可以将疏水涂层提供在电介质上。

[0299] 在某些实施方案中,可以将微通道形成在第三基底上,所述第三基底可以设置在电极阵列49所设置的第一基底的第二区域上。例如,第三基底可以粘合到第一基底的第二区域上,其中微流体电极阵列设置在第一区域中。所述基底可以具有预先形成的微通道,或微通道可以在粘合步骤以后形成。具有第二微通道的第四基底可以设置在含有所述微通道的基底的顶部以提供图2C-2H中描绘的集成装置。所述纳米孔层可以在两个微通道的相交位置处设置在任一个微通道上。因而,形成纳米孔模块的基底可以包括在任一个末端处和在一个侧面上开放的微通道。第四基底在第三基底上面的布置会封闭微通道,由此形成毛细管通道(例如,61和62)。

[0300] 在某些实施方案中,可以在单独基底上形成微通道,所述单独基底可以设置在微流体电极阵列所设置的第一基底上。例如,另一个基底可以粘合到第一基底的第二区域上,其中微流体电极阵列设置在第一区域中。所述基底可以具有预先形成的微通道,或微通道可以在粘合步骤以后形成。具有第二微通道的另一个基底可以设置在含有所述微通道的基底的顶部以提供图2C-2H中描绘的集成装置。所述纳米孔层可以在两个微通道61和62的相交位置处设置在任一个微通道上。

[0301] 在某些实施方案中,可以将微通道引入第二区域中,所述第二区域邻近微流体电极阵列所设置的第一基底上的第一区域。例如,可以将微通道蚀刻在第二区域的顶表面上。可以将纳米孔层放在所述微通道上的一个位置处。所述纳米孔层可以包括预形成的纳米孔。在替代实施方案中,可以在将所述层定位在所述微通道上的一个位置处以后形成纳米孔。通过将微通道引入在第三基底的底表面上,可以制备第三基底。所述第三基底可以定位在第一基底上的第二区域上面,使得第一基底的第二区域的顶表面横过它的顶表面与第三

基底的底表面接触,由此建立封闭的毛细管通道61和62。

[0302] 图2I-2K描绘了这样的装置:其中数字微流体模块250和纳米孔模块260共享共同的底(第一)基底210,在其上面将微流体模块的电极阵列249(一系列可单独控制的电极)设置在第一区域上,且在第二区域中形成微流体通道261。第一基底中的微流体通道261与转移电极271对齐。具有单个连续电极255(例如,参比电极)的第二基底220以与数字微流体模块250中的电极阵列249间隔的方式设置。包含形成在第三基底的较低表面中的微流体通道262的第三基底230放在第一表面210的第二区域上面,由此覆盖在其中形成微流体通道261的第一基底的顶表面。纳米孔模块中的第一基底和第三基底封闭微流体通道261和262,由此提供毛细管通道261和262。应当理解,“微流体通道”和“微通道”在本文中互换地用于表示基底表面中的通道或切出部分。在将基底布置在通道上面以后,封闭所述通道从而形成毛细管通道。类似于图2C,所述毛细管通道可以在微流体模块250和纳米孔模块260之间的接口100处在一个末端流体地连接至微流体模块,且在另一个末端上具有蓄池或排出口。在其它实施方案中,第二毛细管通道262可以与图2H中的毛细管通道62类似地构造,即,第二毛细管通道262可以不在任一个末端连接至微流体模块,且可以在两个末端连接至蓄池/排出口。在图2I中描绘了所述装置的顶视图,且在图2I(续)中描绘了在所述模块之间的接口处所述装置的横截面的前视图。如从前视图中可见,微滴265a是在高于通向毛细管通道261的入口的平面上。为了允许微滴265a流入毛细管通道261,在第三基底230的侧边缘中建立凹槽280以提供空间用于所述微滴向下运动进微通道261中。因而,通过由凹槽280形成的垂直端口提供所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的流体连接,从而在接口100处在第一毛细管通道261的一个末端提供在第一毛细管通道261的顶部分中的开口。应当理解,图2I中的凹槽280没有按大小绘制,并且可以具有任意合适的大小,其允许转移电极271和第一毛细管通道261之间在接口100处的流体连通。此外,所述凹槽可以在大小上变化。例如,所述凹槽可以是在接口100处沿着第三基底230的侧边缘长度延伸的切出部分,且可以成比例以匹配转移电极271的宽度或毛细管通道261的宽度或二者之间的长度。所述切出部分可以在名义上沿着第三基底230的宽度延伸,使得毛细管通道261的相对微小区域未被覆盖。在其它实施方案中,所述切出部分可以在毛细管通道261的大长度上面延伸。含有纳米孔的层270在两个毛细管通道相交的位置跨第一毛细管通道261定位。层270定位在支持基底275中。在某些情况下,第一基底210可以是玻璃基底,且支持基底275可以是PDMS垫圈。

[0303] 在图2J中描绘了图2I所示的装置的横截面的侧视图。所述横截面是在第一毛细管通道261与第一转移电极271对齐的装置区域处。也描绘了具有电极阵列249的微流体模块250的部分,具有单个电极255(例如,参比电极)的第二基底220以与电极阵列249间隔的方式定位。如在图2J中所示,单个电极255没有覆盖转移电极。尽管在这些图中没有图示,第二基底220和单个电极255(其可以是参比电极)可以覆盖转移电极271和272,从而提供双平面电极构型。在该实施方案中,使用双平面电极可以使微滴向转移电极271和272移动。第一毛细管261位于第一基底210中,且位于低于微滴265a所在平面的平面中。包括第二微通道(其被第一基底210的顶表面封闭以提供毛细管通道262)的第三基底230设置在所述第一基底上面。第三基底230包括在接口100处在邻近微流体模块的侧边缘处的凹槽280(或切出部分)。凹槽280在毛细管通道261的末端处在顶部分上向毛细管261开放,从而提供用于进入毛细管通道261的垂直端口。如箭头方向所示,微滴向下移动至毛细管261并然后前进以流

向所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道的相交处。第二毛细管通道262在纳米孔层270的位置与第一毛细管261相交。描绘了定位在第一毛细管通道261上面(且在第二毛细管通道262下面)的支持基底275。支持基底275包括纳米孔层270。如在插图显示的纳米孔层的顶视图中所示,支持基底275包围所述纳米孔层。在某些实施方案中,所述支持基底可以是在中央具有切出部分的第一层和在中央具有切出部分的第二层。所述纳米孔层可以设置在第一层和第二层之间的切出部分处。支持基底中的纳米孔层可以用在这样的装置中:其中底基底210由玻璃制成。

[0304] 图2K显示了图2I所示的装置的横截面的另一个侧视图。在图2J中,所述横断面是在第一转移电极271的位置。在图2K中,所述横断面是在第二转移电极272的位置。如在图2K中所示,通向第二毛细管通道262的入口与存在于第二转移电极272上的微滴265b的位置对齐。在图2K中也描绘了第一毛细管通道261,其在纳米孔层270的位置处与第二毛细管通道262相交。

[0305] 在另一个实施方案中,如在图2L中所示,第一基底210可以包括:第一部分210a,在其上面设置电极阵列249和转移电极271和272;和第二部分210b,在其上面设置含有毛细管通道261a的基底290。类似于图2I-2K中所示的装置,毛细管通道261a是在转移电极所在的平面以下。毛细管通道262位于基底230中,其中通向毛细管通道262的入口与微流体模块250中的转移电极在同一个平面。此外,类似于图2I-2K,通向毛细管通道262的入口与转移电极272对齐。因而,定位在电极272上的微滴可以基本上水平地移动至毛细管通道262。类似于图2I-2K中所示的装置,基底230包括在基底230的侧边缘中的凹槽280以提供空间用于定位在转移电极271上的微滴向下移动至位于基底290中的毛细管261a。在图2L中还描绘了纳米孔层270。在该实施方案中,所述纳米孔层在没有支持层275存在下直接设置在基底290上。例如,在其中含有所述通道的两个基底都由PDMS形成的实施方案中,所述纳米孔层可以在没有支持基底存在下直接设置在基底之间。图2L顶图描绘了在转移电极271和毛细管通道261a所位于的位置处穿过所述装置的横断面的侧视图。图2L底图描绘了在转移电极272和毛细管通道262所位于的位置处穿过所述装置的横断面的侧视图。从顶部看,所述装置看起来与图2I所示的装置相同。因而,转移电极271和272与图2I所示的装置中的转移电极71和72一样间隔。

[0306] 将纳米孔层定位在装置中以后,可以制造在纳米孔模块中的电极用于经由纳米孔横过所述纳米孔层运输分子。例如,可以将电极设置在开口中,所述开口引入基底中并定位在毛细管通道中,使得它们暴露在所述毛细管通道中并且将与存在于毛细管通道中的流体接触。基于毛细管通道的阻力、宽度、直径和/或长度,可以经验地确定电极与纳米孔的距离。

[0307] 纳米孔层可以设置在任一个通道上。纳米孔层可以通过等离子体粘合或经由可压缩的元件(诸如垫圈)粘附至含有微通道的基底的表面。在某些情况下,含有第一通道的基底可以是玻璃基底。在该实施方案中,支持基底(例如,PDMS层)可以用于定位纳米孔层。例如,可以给纳米孔层提供PDMS垫圈。

[0308] 可以采用任何合适的方法在基底上形成通道。在某些情况下,可以使用光刻或浮雕来建立纳米孔模块的通道。在其它实施方案中,可以将通道蚀刻进基底中。在某些实施方案中,可以使用合适方法的组合在基底中形成通道。例如,可以使用蚀刻方法在玻璃基底中

形成一个通道,且可以使用适当的方法例如软光刻、纳米刻印光刻、激光消融或浮雕(例如,软浮雕)在PDMS基底中形成另一个通道。可以经验地确定微通道的高度/宽度/直径。微通道的高度/宽度/直径可以是在0.5 μm 至约50 μm 的范围内,例如,0.5 μm -40 μm 、1 μm -30 μm 、2 μm -20 μm 、3 μm -10 μm 、5 μm -10 μm ,例如,0.5 μm 、1 μm 、2 μm 、3 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 、10 μm 、15 μm 、20 μm 、30 μm 、40 μm 或50 μm 。如本文中指出的,所述通道的高度/宽度/直径可以沿着所述通道的长度变化。

[0309] 在某些实施方案中,纳米孔层(例如,70或270)可以包括在所述纳米孔层的一个或两个侧面上的绝缘材料涂层。所述绝缘材料可以减小接触电容并降低与分子穿过纳米孔层中的纳米孔的转移的检测有关的噪音。在另一个实施方案中,可以减小纳米孔层暴露于流体的表面积,所述流体在与所述纳米孔层流体接触的毛细管通道(例如,毛细管通道61和62、或261和262)中。减小与含有要通过纳米孔检测或计数的分子的流体发生接触的纳米孔层的表面积,可以使接触电容最小化并降低背景噪音。通过减小在纳米孔层的位置处的毛细管通道的大小,可以减小与毛细管通道中的流体接触的纳米孔层的表面积。例如,可以减小在纳米孔层的位置处的毛细管通道的高度或宽度或二者(例如,直径)。在另一个实施方案中,可以减小纳米孔层的表面积。在某些装置中,可以包括用于减小接触电容的这些实施方案的组合。例如,在某些实施方案中,如本文中包括的集成装置可以包括在纳米孔层的位置处具有减小的尺寸的毛细管通道,和/或可以包括在纳米孔层的一个或两个侧面上用绝缘材料(例如,PDMS)包被的纳米孔层,和/或可以包括具有最小表面积的纳米孔层。

[0310] 图3解释了包括微流体模块300和纳米孔模块325的另一种示例性集成装置。与图1A、1B、2A和2B中的纳米孔模块不同,纳米孔模块325不作为独立装置起作用,而是在与微流体模块300集成以后作为纳米孔起作用。微流体模块300包括开口302,其大小允许插入纳米孔模块325。如在图3中描绘的,微流体模块包括要使用纳米孔模块325分析的流体微滴301,所述纳米孔模块325含有具有纳米孔305的层311。在将纳米孔模块325插入微流体模块300后,建立被层311间隔的第一隔室306和第二隔室307。层311也跨纳米孔305分割流体微滴301。

[0311] 图4提供了一种集成装置400,其中数字微流体模块包括嵌入式纳米孔模块。在图4中,纳米孔模块定位在微流体模块中产生流体微滴401的区域的下游。微流体模块使微滴401向纳米孔模块移动,使得微滴401跨层402分割并定位在纳米孔403处。图4显示了所述装置的顶视图。为了清楚起见,没有显示顶基底。已经描绘了纳米孔层402中的纳米孔403,尽管从顶视图看,纳米孔403不可见。纳米孔层402可以附接到底基底或顶基底。

[0312] 在图1A、1B、2A、2B、3和4中,尽管显示了单个纳米孔,但是应当理解,所述层可以包括一个或多个纳米孔。另外,超过一个微滴可以定位在纳米孔模块或装置中。通过跨纳米孔施加电压,可以分析微滴。施加电压可以导致带电荷的分子横过纳米孔的运动。当标签穿过纳米孔转移时,横过纳米孔的电流的减小会提供转移的指示。在某些实施方案中,纳米孔模块的隔室可以不填充导电溶液(例如,缓冲液)——所述导电溶液可以在流体微滴定位成横过纳米孔层后立即由其提供。在某些情况下,纳米孔装置的壁和纳米孔层可以限定第一隔室和第二隔室,跨所述隔室施加电压用于测量存在于流体微滴中的标签/适体的转移(例如,参见图1B和2B)。第一隔室和第二隔室在引入流体微滴之前可以是空的,或可以含有导电液体。在其它情况下,第一隔室和第二隔室可以由微流体模块的壁和纳米孔层限定(例

如,参见图3)。在其它情况下,第一隔室和第二隔室可以由横过纳米孔层分割的流体微滴限定(例如,参见图1A、2A和4)。在某些情况下,可以将电压(其用于指导带电荷的分子横过纳米孔)施加于流体微滴,例如,在其中导电溶液不存在于隔室中的实施方案中。可以经由与流体微滴直接或间接接触的电极将电压施加于流体微滴。应当理解,纳米孔层的大小大于微滴的大小,使得所述微滴横过所述层分割且仅经由纳米孔连接。

[0313] 图5A、5B、6和7解释了具有数字微流体模块和纳米孔层的装置中的微滴运动。在图5A中,描绘了集成的数字微流体/纳米孔装置450的部件。顶视图表明,要使用纳米孔层402中的纳米孔403分析的微滴401定位成横过纳米孔层402。为了解释目的,这里显示了纳米孔403,尽管从顶视图看,纳米孔不可见。装置450包括在其上面设置电极阵列405的基底411。通过横过纳米孔层402分割微滴,使用电极阵列定位微滴401。箭头451和452描绘了微滴401可以横过电极阵列向纳米孔层402移动的方向。在微滴401横过纳米孔层402定位后,可以激活定位在微滴401下面的电极404和406以提供跨纳米孔层402的示差电压,由此促进在微滴401中的分子(例如,被切割的标签或适体)跨纳米孔403的运动。电极404和406是双功能电极,它们用于使微滴向纳米孔层移动并驱动标签/适体横过纳米孔403。

[0314] 图5B描绘了装置450的侧视图,在这里描绘了在图5A所示的顶视图中省略的顶基底412。显示的顶基底412包括电极414。电极414可以是单个电极或电极阵列。纳米孔层从顶基底延伸至底基底。微滴401横过纳米孔层402分割。尽管在图5B中描绘了双平面电极,所述装置可以不包括在两个基底中的电极;相反,顶基底或底基底可以包括共平面电极。在微滴401附近的电极404和406具有相反极性并驱动标签/适体横过纳米孔403。

[0315] 图6显示了微滴401横过具有纳米孔403的纳米孔层402的分割。1a描绘了电极405使微滴在箭头指示的方向向纳米孔层402移动。在2a中,微滴401已经被纳米孔层402分割且定位,使得所述微滴经由纳米孔403连接。在3a中,定位成在微滴401下面横过纳米孔层402的电极被激活以提供阳极(-)和阴极(+). 激活的电极驱动存在于微滴401中的带负电荷的分子(包括正在计数的标签/适体)穿过纳米孔403。随着所述标签/适体穿过纳米孔403转移,可以如本文中解释的计数标签/适体的数目。步骤3a用于收集当微滴被分割时横过纳米孔层被分割在微滴的一个侧面的所有标签/适体。

[0316] 一旦基本上所有的标签/适体已经转移至纳米孔膜的一个侧面,可以反转电极的极性,如在4a中所示,并将标签/适体转移至纳米孔层402的另一侧并计数。在步骤3a中计数的标签的数目应当是在步骤4a中得到的计数的大约一半。可以将反转电极的极性和计数标签/适体的步骤重复任意次数以得到微滴中的标签/适体的数目的多个读出。

[0317] 图7、1b和2b显示了两个微滴600a和600b在箭头指示的方向移动至纳米孔层604。一旦在纳米孔层604处,所述微滴润湿纳米孔层并经由纳米孔605流体地连接(3b)。在步骤4b中,定位在微滴600a下面的电极被激活以充当阴极,且定位在微滴600b下面的电极被激活以充当阳极,并将带负电荷的被切割的标签/解离的适体驱动至微滴600a并计数。在步骤5b中,将电极的极性反转,并将存在于微滴600a中的带负电荷的被切割的标签/解离的适体驱动至微滴600b并计数。可以将反转电极的极性并计数被切割的标签/解离的适体的步骤重复任意次数以得到微滴中被切割的标签/解离的适体的数目的多个读出。两个微滴600a和600b可以都是样品微滴(例如,含有要计数的分子的微滴)或缓冲液微滴(例如,用于在将样品微滴定位在纳米孔处之前润湿纳米层)。在某些实施方案中,所述微滴之一可以是缓冲

液微滴,而其它微滴可以是样品微滴。可以将标签/适体计数一次或多次。

[0318] 图8解释了来自侧视图的集成的数字微流体和纳米孔装置。基底91和92以间隔方式定位。基底92包括电极97,且基底91包括电极阵列95。支持结构98将纳米孔层94附接至基底92。在其它实施方案中,支持结构98可以附接到底基底91。电极阵列95用于将微滴99移动至纳米孔层94,在此处纳米孔层分割所述微滴并经由纳米孔93流体地连接所述微滴的两侧。电极96和97用于驱动微滴99中的标签/适体穿过纳米孔93。如上面所指出的,可以反转电极96和97的极性以穿过纳米孔转移标签/适体许多次。

[0319] 尽管所述图描绘了单个纳米孔,但是应当理解,超过一个纳米孔可以存在于纳米孔层中。侧接纳米孔层并用于提供跨纳米孔层的电压差的电极可以与或不与定位在纳米孔层处的微滴直接接触。

[0320] 流体微滴在微流体和纳米孔装置、模块和集成装置中的运动可以通过任意合适的方式实现。如果适用的话,用于使流体微滴在不同装置/模块和通道中移动的方式可以是相同的或不同的。例如,使用流体操纵力,例如,电润湿、介电电泳、光诱导电润湿、电极介导、电场介导、静电驱动等或它们的组合,可以使流体微滴在微流体装置或模块中移动。流体微滴通过流体连接(例如,通道)从微流体模块向纳米孔模块的运动可以是经由扩散、布朗运动、对流、泵送、施加的压力、重力驱动、密度梯度、温度梯度、化学梯度、压力梯度(正或负)、气动压力、产生气体的化学反应、留心流动、毛细管压力、芯吸、电场介导、电极介导、电泳、介电电泳、磁迁移、磁场、磁力驱动的流动、光学力、趋化性、趋光性、表面张力梯度驱动的流动、Marangoni应力、热-毛细管对流、表面能梯度、声迁移、表面声波、电渗流、热迁移、电润湿、光诱导电润湿或其组合。流体微滴可以经由流体操纵力(例如,电润湿、介电电泳、光诱导电润湿、电极介导、电场介导、静电驱动等或它们的组合)在纳米孔模块中移动并定位成横过纳米孔层。使用电势、静电势、电动流动、电渗流、压力诱导的流动、电泳、电泳运输、电渗运输、扩散运输、电场介导的流动、介电电泳介导的标签/适体运输和本领域技术人员已知的其它方法或其组合,可以使微滴中的标签/适体穿过纳米孔转移。

[0321] 本发明的示例性实施方案包括如下计数存在于定位成横过纳米孔层的微滴中的标签的数目:首先将基本上所有的标签转移至所述纳米孔层的同一侧以将所有标签收集在顺或反隔室中,随后将所述标签转移至所述纳米孔层的另一侧并计数穿过所述纳米孔层中的纳米孔转移的标签的数目。本文中使用的“顺”和“反”在纳米孔层的上下文下表示纳米孔层的相对侧。这些术语用于在纳米孔层的一侧的上下文以及纳米孔层的一侧上的隔室的上下文中使用。从所述装置的描述会理解,顺和反隔室可以由壁、基底等所限定的物理结构限定。在某些情况下,顺和反隔室可以由横过纳米孔层放置的微滴限定。所述微滴可以在所述微滴的一个或多个侧面上与壁或基底接触。在某些情况下,顺和反隔室可以由微滴限定,顺隔室可以从纳米孔层的顺侧延伸至在顺侧上的微滴部分的周围,且反隔室可以从纳米孔层的反侧延伸至在反侧上的微滴部分的周围。在每个顺和反侧上的微滴部分可以与基底接触。因而,所述顺和反隔室可以由微滴的周围、基底的部分和纳米孔层的组合限定。

[0322] 在某些情况下,微流体装置和/或微流体模块可以包括与样品微滴和试剂微滴不可混溶的惰性流体。例如,所述惰性流体可以是比水更稠密的重流体,诸如与在微流体模块中产生和加工的流体微滴不可混溶的油。所述惰性流体可以促进流体微滴的形成以及增加流体微滴的形状的稳定性,且可以进一步用于保持不同的微滴在空间上彼此分离。示例性

的惰性流体包括极性的液体、硅油、氟硅油、烃、烷烃、矿物油和石蜡油。在某些情况下，微流体装置或模块和惰性流体可以是如在US20070242105中公开的，其在本文中通过引用整体并入。在其它实施方案中，在所述装置中没有包括不可混溶的流体。在这些实施方案中，环境空气填充所述装置中的空间。

[0323] 本文中使用的“微滴”和“流体微滴”可互换地用于表示离散的液体体积，其是大致球形的形状且在至少两个侧面上被微流体装置、纳米孔装置、微流体模块或纳米孔模块的壁或基底约束。“大致球形的”在微滴的上下文中表示形状诸如球形，特别是扁球，例如，圆盘形、棒条形、截短的球体、椭圆柱体、半球形或卵形。本文公开的微流体和纳米孔模块和装置中的微滴的体积可以在约10 μL 至约5 pL 的范围内，例如，10 μL - 1 pL 、7.5 μL -10 pL 、5 μL -1 nL 、2.5 μL - 10 nL 或1 μL - 100 nL ，例如，10 μL 、1 μL 、800 nL 、400 nL 、100 nL 、10 nL 或更小。

[0324] 在某些实施方案中，所述集成装置可以包括具有嵌入式纳米孔模块的微流体模块。所述集成装置可以包括第一基底和第二基底和分隔所述第一基底和第二基底的间隙，所述间隙(其可以填充空气或不可混溶的液体)提供空间，在其中样品微滴与第一结合成员(固定化在磁珠上或两个基底之一上)接触；任选地执行洗涤步骤；随后使与所述第一结合成员结合的分析物接触所述第二结合成员；可以执行任选的混合和洗涤步骤；并切割附接到所述第二结合成员的标签以产生含有被切割的标签的微滴。然后可以使含有被切割的标签的微滴定位横过位于所述第一基底和第二基底之间的间隙中的纳米孔层。

[0325] 如本文中指出的，通过众多方式，例如，使用可编程的流体操纵力(例如，电润湿、介电电泳、静电驱动、电场介导、电极介导的力、SAW等)，可以在集成装置中移动微滴。在某些情况下，微流体装置和模块通过使用电极可以移动样品和试剂的微滴用于进行分析物分析。所述电极可以是共平面的，即，存在于相同基底上，或呈面对取向(双平面)，即，存在于第一基底和第二基底中。在某些情况下，微流体装置或模块可以具有如在美专号6,911,132(其在本文中通过引用整体并入)中所述的电极构型。在某些情况下，所述装置可以包括与第二基底由间隙间隔的第一基底；所述第一基底可以包括一系列定位在较上表面上的电极；电介质层可以设置在第一基底的较上表面上并覆盖所述系列电极以给微滴的运动提供基本上平面的表面。任选地，可以将疏水材料层放置在电介质层的较上表面上以提供基本上平面的表面。在某些情况下，所述第一基底可以包括共平面电极——例如，存在于单个基底上的驱动/控制电极和参比电极。在其它情况下，定位在第一基底上面的第二基底可以包括在第二基底的较低表面上的电极，其中第二基底的较低表面面向第一基底的较上表面。在第二基底上的电极可以被绝缘材料覆盖。所述系列电极可以沿着微流体模块的长度在纵向方向布置，或沿着微流体模块的宽度在横向方向布置，或二者(例如，二维阵列或网格)。在某些情况下，所述电极阵列可以由计算机的处理器激活(例如，开启和关闭)，所述计算机以可编程的方式可操作地偶联到用于移动微滴的装置。用于驱动微流体装置中的微滴的装置和方法是已知的。在示例性情况下，微流体模块可以类似于本领域中已知的微滴驱动器。例如，第一(底)基底可以含有可单独控制的电极的模式化阵列，且第二(顶)基底可以包括连续的接地电极。用疏水材料包被的电介质绝缘体可以包被在电极上面以降低表面的润湿性和增加微滴和控制电极(电极的模式化阵列)之间的电容。为了移动微滴，可以将控制电压施加于邻近微滴的电极(在电极阵列中)，并与此同时，将刚好在微滴下面的电极

去激活。通过改变沿着直线电极阵列的电势,可以使用电润湿来沿着该行电极移动微滴。

[0326] 第一基底和第二基底可以由任意合适的材料制成。合适的材料包括、但不限于纸、薄膜聚合物、二氧化硅、硅、经处理的硅、玻璃(刚性的或柔性的)、聚合物(刚性的、柔性的、不透明的或透明的)(例如,聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)和环状烯烃共聚物(COC)、聚苯乙烯(PS)、聚碳酸酯(PC)、印刷的电路板和聚二甲基硅氧烷(PDMS)。在某些情况下,至少第一基底或第二基底可以是基本上透明的。基本上透明的基底可以用在这样的装置中:在其中执行附接到第二结合成员的标签的光切割。在其中共平面电极存在于基底之一中的实施方案中,所述电极可以是或不是透明的。在其它实施方案中,例如,其中电极处于面对取向(存在于两个基底中),在所述基底中的至少一个上的电极可以是基本上透明的,例如,所述电极可以由氧化铟锡制成。所述电极可以由任意合适的材料制成。所述电极可以由任意导电材料(诸如纯金属或合金或其它导电材料)制成。例子包括铝、碳(诸如石墨)、铬、钴、铜、镓、金、铟、铊、铁、铅、镁、汞(作为汞齐)、镍、铈、钕、钐、钨、铂、铼、铯、铷、硅(诸如高度掺杂过的多晶硅)、银、钽、锡、钛、钨、钒、锌、锆、其混合物和这些元素的合金或金属化合物。在某些实施方案中,所述导电材料包括碳、金、铂、钯、铱、或这些金属的合金,因为这样的贵金属和它们的合金在含水环境中是惰性的。

[0327] 在某些情况下,第一基底或第二基底可以在间隙中具有固定化在其上面的第一结合成员。例如,与第二基底表面处于面向关系的第一基底表面可以包括在其上面设置第一结合成员的区域。如本文中指出的,使用任何常规方法,可以将第一结合成员(例如,多肽,例如,受体、抗体或其功能片段)固定化在固体基底表面上。在某些情况下,在所述间隙中在第一基底或第二基底的表面上的第一个位置可以仅包括一类结合成员(例如,单一类型的抗体)。在其它实施方案中,在所述间隙中在第一基底或第二基底的表面上的第一个位置可以仅包括多个不同的结合成员,用于分析多种分析物。可替换地,所述装置可以包括在第一基底或第二基底的表面上的多个位置,其中每个位置可以包括固定化在其上面的不同第一结合成员。

[0328] 在其中在间隙中的第一基底或第二基底表面具有多个用于固定化不同第一结合成员的位置的实施方案中,所述位置可以沿着装置的长度直线地布置。可以使样品微滴直线地移动以依次接触所述多个位置中的每一个。在另一个实施方案中,可以将样品分割成多个微滴,且每个微滴可以独立地接触所述多个位置中的每一个。如本文中指出的,所述第一结合成员可以没有附接到第一基底或第二基底,且可以附接到珠子,所述珠子可以作为例如微滴引入微流体装置中。

[0329] 如本文中指出的,可以将样品和用于测定所述样品的任何试剂操纵为离散体积的流体,其可以使用可编程的流体操纵力(例如,电润湿、介电电泳、静电驱动、电场介导、电极介导的力等)在第一基底和第二基底之间移动。例如,所述第一基底和第二基底中的至少一个可以包括用于操纵离散体积的流体的电极阵列,例如,使微滴在第一基底和第二基底之间从一个位置移动至另一个位置,混合,融合,分割,稀释,等。在另一个实施例中,可以使用表面声波来移动微滴用于分析物分析方法。

[0330] 在另一个实施方案中,所述微流体模块可以通过使用表面声波移动样品和试剂的微滴用于进行分析物分析。在这些实施方案中,第一基底可以是有助于表面声波的传播的薄平面材料。第一基底可以是压电晶体层,诸如铌酸锂(LiNbO₃)、石英、LiTaO₃晶片。在某些

情况下,压电晶片可以可除去地偶联到上基底,其中从换能器产生的表面声波(SAW)经由设置在压电晶体层和上基底之间的偶联介质传输至上基底。上基底的较上表面可以被第二基底覆盖,且微滴可以经由连接至压电晶体层的相互交叉的换能器产生的SAW在第二基底和上基底的较上表面之间的空间中移动。在某些情况下,微流体模块可以是在W02011/023949(其在本文中通过引用并入)中描述的SAW微流体装置。

[0331] 在一个替代实施方案中,微流体模块可以包括与第二表面间隔的第一表面,在所述第一表面和所述第二表面之间具有空间,在其中操纵样品和试剂微滴用于执行本文中公开的样品分析。微流体装置还可以包括:偶联到第一表面的表面声波(SAW)产生材料层;和换能器电极结构,其布置在SAW产生材料层处以在第一表面处提供表面声波(SAW)用于传播至第一表面上的微滴,其中所述第一表面具有至少一个SAW散射元件用于影响在第一表面处的SAW的传播、分布和/或行为,且其中所述SAW产生材料选自:多晶材料、有纹理的多晶材料、在双轴上有纹理的多晶材料、微晶材料、纳米晶体材料、非晶体物质和复合材料。在某些情况下,SAW产生材料可以是铁电材料、热电材料、压电材料或磁致伸缩材料。SAW散射元件的布置可以实际上提供声子晶体结构,其与在第一表面处的声场相互作用或影响所述声场以影响第一表面上的微滴的运动。在某些情况下,微流体模块可以是在US20130330247(其在本文中通过引用并入)中描述的SAW微流体装置。SAW微流体装置可以与纳米孔装置结合使用,或可以具有与其集成的纳米孔模块。

[0332] 本文中所述的装置可以与另一个或多个装置(例如,电源、声波产生器等)结合使用。

[0333] 可以用于实现本文所述方法步骤的装置还可以包括用于供给试剂和收集废物的工具。这样的工具可以包括隔室、吸收垫、蓄池等。这些工具可以流体地连接至所述装置。

[0334] 微流体模块可以流体地连接至用于供给样品分析试剂(例如,第一结合成员、第二结合成员、洗涤缓冲液、切割诱导剂等)的蓄池。纳米孔模块可以流体地连接至用于收集废物的蓄池、用于向顺和反隔室供给导电溶液的蓄池等。

[0335] 所述集成装置可以是自动的或半自动的,且可以可除去地偶联到外壳,所述外壳包含用于给电极供给电压的电源和用于存储指令的随机存取存储器,所述指令是关于:使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含与其附接的可切割标签;除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员;切割与第二结合成员附接的标签,所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物;穿过或横过层中的纳米孔转移所述标签;确定穿过所述层转移的标签的数目;基于在固定的时间区间中穿过所述层转移的标签的数目或转移已知数目的标签所需的时间,测量所述样品中的分析物。如本文中指出的,使用控制装置的处理器的,可以执行分析物分析方法。例如,可以将所述装置编程以执行本文中公开的分析物分析,包括本文中公开的任何任意的混合、温育和洗涤步骤。所述外壳还可以包括处理器用于执行在所述存储器中存储的指令。本文中所述的装置可以包括用于处理来自纳米孔装置或模块的电信号的数据采集模块(DAQ)。在某些情况下,还可以包括用于处理电信号并实现最佳信噪比的膜片箱放大器。

[0336] 在某些情况下,本文中所述的装置可以与用于自动地执行分析物分析方法的至少

一些步骤的系统结合。在图9中显示了这样的系统的一个实施例。所述示例性系统包括处理部件60,其包括具有处理器和内存的数据处理单元63,所述数据处理单元63可操作地偶联到显示器61和变送器/接收器单元62,所述变送器/接收器单元62与本发明68的装置的接收器/变送器单元69发生通讯64。装置68由处理部件60控制,所述处理部件60执行指令(程序的步骤)以执行本文公开的分析物分析方法的至少一些步骤。在某些情况下,处理部件60可以是计算机、具有用于插入所述集成装置的开口的量器(所述开口可以是狭槽,所述狭槽的大小和形状设置成适应所述装置并可操作地连接至所述装置)或它们的组合。处理部件60和装置68之间的通讯64可以是有线的或无线的。装置68可以是本文中与微流体66和纳米孔67功能性一起描述的任何装置。在某些情况下,可以将本文公开的装置中的微滴的运动编程,如在美国专利号6,294,063(其在本文中通过引用整体并入)中公开的。

[0337] 可以用被设计成执行本文所述功能的通用处理器、数字信号处理器(DSP)、专用集成电路(ASIC)、现场可编程门阵列(FPGA)或其它可编程的逻辑装置、离散门或晶体管逻辑、离散硬件部件或它们的任意组合实现或执行与本文中的实施方案关联地描述的多种示例性方法。通用处理器可以是微处理器,但是在替代方案中,所述处理器可以是任何常规处理器、控制器、微控制器或状态机。所述处理器可以是计算系统的部分,所述计算系统也具有与用户界面通讯的用户界面端口,并且其接收用户输入的命令,具有至少一个存储电子信息(包括在控制器的控制下运行且经由用户界面端口通讯的程序)的存储器(例如,硬驱或其它可比较的存储器和随机存取存储器)和视频输出(其经由任何种类的视频输出形式,例如,VGA、DVI、HDMI、DisplayPort或任意其它形式,产生它的输出)。

[0338] 处理器也可以作为计算装置的组合实现,例如,DSP和微处理器的组合,多个微处理器,与DSP核心结合的一个或多个微处理器,或任意其它这样的构型。这些装置也可以用于选择本文所述装置的值。照相机可以是基于光电管、光电二极管、自动像素传感器(CMOS)、CCD、光敏电阻器、光伏电池或其它数字图像捕获技术的照相机。

[0339] 与本文公开的实施方案关联地描述的方法或算法的步骤可以直接地体现在硬件中,在处理器执行的软件模块中,或在二者的组合中。软件模块可以安设在随机存取存储器(RAM)、闪速存储器、只读存储器(ROM)、电学上可编程的ROM(EPROM)、电学上可擦除的可编程的ROM(EEPROM)、寄存器、硬盘、可移动磁盘、CD-ROM、云或本领域已知的任意其它形式的存储介质中。一种示例性的存储介质偶联到处理器,使得所述处理器可以读出来自存储介质的信息和向存储介质书写信息。在替代方案中,存储介质可以与处理器成为一体。处理器和存储介质可以安设在ASIC中。ASIC可以安设在用户终端中。在替代方案中,处理器和存储介质可以作为分立元件安设在用户终端中。

[0340] 在一个或多个实施例实施方案中,所述功能可以在硬件、软件、固件或它们的任意组合中实现。如果在软件中实现,所述功能可以存储在计算机可读介质上、在计算机可读介质上传输或在计算机可读介质上产生作为一个或多个指令、代码或其它信息的分析/计算数据输出。计算机可读介质包括计算机存储介质和通讯介质,包括促进计算机程序从一个地方转移至另一个地方的任何介质。存储介质可以是可被计算机访问的任何可得到的非短暂介质。作为例子,这样的计算机可读介质可以包括RAM、ROM、EEPROM、CD-ROM或其它光盘存储器、磁盘存储器或其它磁性存储装置,或可以用于以指令或数据结构的形式携带或存储所需程序代码且可以被计算机访问的任意其它介质。所述记忆储存器还可以是旋转磁性硬

盘驱动、光盘驱动或基于闪速存储器的存储驱动或其它这样的固态、磁性或光学存储装置。本文中使用的磁盘(disk)和光盘(disc)包括压缩磁盘(CD)、激光盘、光盘、数字多功能光盘(DVD)、软盘和蓝光光盘,其中磁盘经常磁性地再现数据,而光盘用激光光学地再现数据。以上各种的组合也应当被包括在计算机可读介质的范围内。

[0341] 在本文公开的实施方案包括内存、存储器和/或计算机可读介质或与其联合运行的范围内,那么该内存、存储器和/或计算机可读介质是非短暂的。因此,在内存、存储器和/或计算机可读介质被一个或多个权利要求覆盖的范围内,那么该内存、存储器和/或计算机可读介质是仅非短暂的。

[0342] 在某些情况下,所述装置可以是微流体装置,诸如芯片上的实验室(lab-on-chip)装置、连续流微流体装置或基于微滴的微流体装置,其中可以在含有或疑似含有分析物的样品微滴中进行分析物分析。可以用在本发明的方法中的示例性微流体装置包括在W02007136386、US8287808、W02009111431、W02010040227、W02011137533、W02013066441、W02014062551或W02014066704中描述的那些。在某些情况下,所述装置可以是数字微流体装置(DMF)、基于表面声波的微流体装置(SAW)、完全集成的DMF和纳米孔装置、或完全集成的SAW和纳米孔装置。在某些实施方案中,DMF元件和纳米孔元件在完全集成的DMF和纳米孔装置中可操作地偶联,或SAW元件和纳米孔元件在完全集成的SAW和纳米孔装置中可操作地偶联。在某些实施方案中,通过基于卷对卷(roll to roll)的印刷电子学方法制造DMF装置或SAW装置。在某些实施方案中,通过基于卷对卷的印刷电子学方法制造DMF元件或SAW元件。在某些实施方案中,所述完全集成的DMF和纳米孔装置或所述完全集成的SAW和纳米孔装置包含微流体导管。在某些实施方案中,所述微流体导管将DMF元件偶联至纳米孔元件,且所述微流体导管包含由被动力或主动力诱导的流体流。

[0343] 示例性的电润湿技术可以参见US8637242。还可以利用微米级的电泳诸如在W02011057197中描述的那种。一种示例性的介电泳技术描述在US6294063中。

[0344] 本发明的装置通常没有外部泵和阀,因而在制备和应用方面是经济的。本文中公开的装置和有关系统、以及本文中公开的所有方法可用于本领域中的用途,例如,用于在样品来源处分析样品,例如,在护理点(例如,在诊所、医院、医师的办公室、核心实验室设备、在家等)。在某些情况下,本发明的装置或系统(例如,也如在本文公开的方法中使用的)包括热源或光源,其被构造成当所述热源或光源被激活时诱导将标签连接至分析物的、热可切割的或光可切割的接头的切割,如本文中所述。

[0345] 本发明也描述了与纳米孔实现装置结合使用的微流体装置和集成的微流体纳米孔实现装置。纳米孔实现装置表示包括可以在其中建立纳米孔的层或膜的装置。本发明的纳米孔实现装置包括被层或膜间隔的两个隔室,其中所述两个隔室包括用于引导电流的离子液体(例如,盐溶液,含有或不含目标分析物)。可以如下在纳米孔实现装置的层中建立纳米孔:在隔室中使用离子液体(例如,盐溶液,含有或不含目标分析物)跨所述层施加电压。如将理解的,本文描述的任何纳米孔装置(与微流体装置结合使用,或与微流体模块集成)最初可以提供为这样的纳米孔实现装置:其包括可以在其中形成纳米孔、但是缺乏纳米孔的层。在使用过程中,例如,在使用纳米孔检测标签的转移之前,可以在纳米孔实现装置中建立纳米孔。在某些实施方案中,含有要通过纳米孔检测的标签的离子液体(例如,盐溶液)可以用于建立纳米孔和用于横过建立的纳米孔转移标签。

[0346] 在某些实施方案中,通过当跨纳米孔层或膜施加基线电压时测量的电流中的噪音水平,评估如上所述通过跨层施加电压建立的纳米孔的特性。

[0347] 在某些情况下,可以调节如上所述通过跨层施加电压建立的纳米孔,以物理地改变纳米孔和得到所需的电渗性质,例如,增加孔径和/或减小当跨纳米孔层或膜施加电压时横过纳米孔测量的电流中的噪音。因而,在某些实施方案中,在集成的数字微流体纳米孔实现装置中产生纳米孔的方法可以包括调节纳米孔。调节可以包括:跨纳米孔层或膜交替地施加具有第一极性的第一电压和具有与所述第一极性相反的第二极性的第二电压,其中所述第一电压和第二电压各自施加至少一次;和测量与所述纳米孔的大小有关的电渗性质。在某些情况下,在所述调节之前测量与所述纳米孔的大小有关的电渗性质,以得到纳米孔的大小的初步估计。

[0348] 所述电渗性质可以是提供纳米孔的大小的估计的任意合适性质。在某些情况下,所述电渗性质由在电压范围(-1 V至1 V的范围,例如,-500 mV至500 mV、-250 mV至250 mV、-200 mV至200 mV、10 mV至500 mV、10 mV至250 mV、10 mV至200 mV,包括15 mV至200 mV)内得到的电流-电压曲线表示。在某些情况下,所述电渗性质是跨纳米孔层或膜测量的电导或电阻。

[0349] 为了改变纳米孔并得到所需电渗性能,第一电压和第二电压可以具有任意合适的量级。在某些情况下,第一电压和第二电压具有100 mV或更多的量级,例如,200 mV或更多、500 mV或更多、750 mV或更多、1.0 V或更多、2.0 V或更多、3.0 V或更多,包括4.0 V或更多,且在有些情况下,具有10 V或更小的量级,例如,9.0 V或更小、8.0 V或更小、6.0 V或更小,包括4.0 V或更小。在某些实施方案中,第一电压和第二电压具有100 mV至10 V范围内的量级,例如,200 mV至9.0 V、250 mV至9.0 V、500 mV至9.0 V、1.0 V至8.0 V,包括2.0 V至6.0 V。

[0350] 为了改变纳米孔并得到所需电渗性能,第一电压和第二电压可以各自施加任意合适的时间长度。在某些情况下,第一电压和第二电压各自施加10毫秒(ms)或更多,例如,100 ms或更多、200 ms或更多、500 ms或更多、1秒(s)或更多、2 s或更多,包括3 s或更多,且在某些情况下,施加10 s或更小,例如,5 s或更小、4 s或更小、3 s或更小、2 s或更小、1 s或更小、500 ms或更小、200 ms或更小,包括100 ms或更小。在某些情况下,第一电压和第二电压各自施加10 ms至100 ms、100 ms至200 ms、200 ms至500 ms、500 ms至1 s、1 s至2 s、2 s至3 s、3 s至4 s、3 s至5 s、或3 s至10 s范围内的持续时间。

[0351] 为了改变纳米孔并得到所需电渗性能,第一电压和第二电压可以各自施加任意合适的次数。在某些情况下,第一电压和第二电压各自施加2次或更多、3次或更多、4次或更多、5次或更多、7次或更多、10次或更多、20次或更多、30次或更多、50次或更多、100次或更多、200次或更多,包括500次或更多,且在某些实施方案中,施加10,000次或更小,例如,5,000次或更小、1,000次或更小、500次或更小、400次或更小、200次或更小、100次或更小,包括50次或更小。在某些实施方案中,第一电压和第二电压各自施加2-50次、10-50次、30-50次、50-100次、100-200次、100-500次、500-1,000次、500-1,000次或500-10,000次。

[0352] 4. 纳米孔模块在DMF模块的一个侧面上的集成

本发明的一个方面包括集成装置,其包括数字微流体(DMF)模块和定位在所述DMF模块的一个外侧面上的纳米孔层(图40)。在DMF模块的内部空间中的微滴可以穿过存在于DMF模

块的第一(例如,顶)或第二(例如,底)基底中的孔(也被称作“开口”)或穿过DMF模块在第一基底和第二基底之间的侧面接近纳米孔层的纳米孔。如上所述,纳米孔层可以包括纳米孔膜或基底,其在有些情况下可以是在透射电子显微镜(TEM)窗口中的商购可得的氮化硅(SiN_x)膜。纳米孔层形成在所述孔上面的密封件,使得在没有纳米孔存在下(即在纳米孔的制造之前,如本文中所述),DMF模块中的液体体积与在纳米孔层的外侧面上或周围的任何液体体积物理上分离。在某些情况下,纳米孔层是纳米孔模块的部分,其中纳米孔层将纳米孔模块内的隔室与DMF模块中的液体体积(例如,在基底孔中的液体微滴,如上所述)间隔。将纳米孔层或模块密封至基底的外表面,使得液体体积(例如,在基底孔中的液体微滴)与外部环境物理上分离。

[0353] 可以将基底中的孔(DMF中的液体微滴穿过它接近纳米孔层)的大小设定成适合液体微滴通过毛细管作用穿过所述孔移动。因而,基底中的孔可以是毛细管通道。所述孔可以具有任意合适的横截面形状和大小以支持液体微滴被动地(例如,通过毛细管作用)穿过所述孔的运动。在某些情况下,在DMF的侧面上的孔的直径比在外侧面(即,面向纳米孔层的那侧)上的孔的直径更宽。在某些情况下,基底的底表面和孔的壁之间的角是直角或钝角(例如,90°或更大,例如,95°或更大,包括100°或更大)。

[0354] 集成的DMF-纳米孔模块装置可以包括一对电极,其可以用于制造纳米孔层中的纳米孔和/或用于检测已经通过DMF模块处理过的目标分析物,如本文别处所述。所述电极对可以由任意合适材料制成,包括、但不限于氧化铟锡(ITO)。可以以任意合适的方式构造所述电极对。在某些实施方案中,一个电极定位在纳米孔模块内的隔室中,且第二电极定位在DMF模块中,通过物理地穿透基底以接近在纳米孔层的另一侧上的液体体积(图40)。

[0355] 在某些实施方案中,第一电极可以是与在DMF模块中使用的单个连续电极(例如,参比电极)相同的电极,且第二电极可以设置在基底的顶表面(即,外表面)上,所述顶表面与在其上面定位第一电极的底表面相对(图43)。在这样的情况下,可以以与底表面类似的方式处理顶表面(例如,用电极材料诸如氧化铟锡和聚合物诸如聚四氟乙烯(包括Teflon®)包被)。因而,在某些情况下,当第二电极是在基底的顶表面(纳米孔层/模块与其附接)上的电极时,相对于DMF模块在纳米孔层的外表面上的液体体积与第二电极发生电接触。用于纳米孔制造的电通道可以表示为:第二电极→液体(外部)→纳米孔膜(没有纳米孔)→液体(在DMF模块内部)→第一电极(与DMF的单个连续电极相同)。第二电极也可以缺少纳米孔层/模块所附接的区域,从而迫使电流进入在纳米孔膜的外侧上的液体,其在有些情况下,可能被包含在纳米孔模块内。

[0356] 在某些实施方案中,如在图44中所示,第一电极是与在第一DMF模块(例如,图44中的“底DMF芯片”)中使用的单个连续电极(例如,参比电极)相同的电极,且第二电极可以由第二DMF模块(例如,图44中的“顶DMF芯片”)提供,所述第二DMF模块在与所述第二DMF模块的单个连续电极有关的对应顶基底中具有孔,且纳米孔层插入在两个DMF模块之间在各个基底中的孔之间。因而,所述第一和第二DMF模块可以在取向上相对于彼此反转,使得与第一DMF模块的单个连续电极有关的顶基底面向与第二DMF模块的单个连续电极有关的顶基底且在后者的近端。所述两个DMF模块可以相对于彼此定位,使得当存在纳米孔层中的纳米孔时,所述两个DMF模块通过纳米孔膜在流体学上和电学上偶联到一起。在纳米孔形成之前,两个DMF模块中的两个流体体积可以彼此分离。在某些情况下,结构层插入在两个DMF模

块之间以提供结构支持和减少弯曲。

[0357] 本文中还提供了如上所述在纳米孔实现层中、在集成的DMF-纳米孔模块装置中制备纳米孔的方法。所述方法的实现可以包括：如本文中所述，使用任意合适的方法将离子液体例如盐溶液（例如，LiCl、KCl等）定位至DMF模块中的孔，和允许毛细管作用以穿过孔移动所述液体（参见，例如，图40）。可以将离子液体（例如，盐溶液）定位在纳米孔实现层（即，在制备纳米孔之前的纳米孔膜）的另一侧上。使用任意合适的方法，例如，但不限于PDMS、压力、蜡、粘合剂等，可以从DMF模块密封纳米孔模块，使得所述孔中的液体体积与在纳米孔膜的另一侧上的液体体积分离。电场（诸如电压）跨纳米孔实现层的施加会导致纳米孔的最终形成，这可以容易地检测到，例如，作为在电流痕迹中的介质击穿。

[0358] 建立纳米孔层中的纳米孔以后，在某些情况下，可能进行调节过程以物理地改变纳米孔和清洁信号。在某些情况下，所述调节包括随时间改变跨纳米孔施加的电压。

[0359] 纳米孔制造以后，可以将DMF模块重新激活以完成转移的任何液体预处理步骤（例如替换DMF中的溶液，诸如用LiCl替换KCl）。预处理以后，可以将DMF液体体积（例如，含有目标分析物的液体样品）定位在所述孔中。然后将DMF系统去激活，并可以活化纳米孔模块以允许和检测转移事件。

[0360] 5. 方法的变体和装置应用的变体

公开的确定目标分析物在样品中的存在或量的方法和微流体装置的应用可以是如上所述。考虑到用于分析分析物的其它方法，还可以改造所述方法和公开的微流体装置的应用。众所周知的变体的例子包括、但不限于，免疫测定，诸如夹心免疫测定（例如，单克隆-多克隆夹心免疫测定，包括酶检测（酶免疫测定（EIA）或酶联免疫吸附测定（ELISA）、竞争性抑制免疫测定（例如，正向和反向）、酶多种免疫测定技术（EMIT）、竞争性结合测定、生物发光共振能量转移（BRET）、一步抗体检测测定、均匀测定、异质测定、运行中捕获（capture on the fly）测定等。在某些情况下，下面的描述可以与上述方法重叠；在其它情况下，下面的描述可以提供替代。

[0361] a) 免疫测定

使用免疫测定可以分析目标分析物和/或肽或其片段。使用本文描述的抗体并检测与目标分析物的特异性结合，可以确定目标分析物的存在或量。可以利用任何免疫测定。所述免疫测定可以是例如酶联免疫测定（ELISA）、竞争性抑制测定，诸如正向或反向竞争性抑制测定或竞争性结合测定。在某些实施方案中，一个标签附接到捕获抗体和检测抗体。可替代地，用于捕获的微粒或纳米颗粒也可以起作用用于检测（例如，在它通过某些方式附接或结合至可切割的接头的情况下）。

[0362] 可以使用异质形式。例如，在从受试者得到测试样品以后，制备第一混合物。所述混合物含有要针对目标分析物进行评估的测试样品和第一特异性结合配偶体，其中所述第一特异性结合配偶体和所述测试样品中所含的任何目标分析物形成第一特异性结合配偶体-目标分析物复合物。优选地，所述第一特异性结合配偶体是抗-目标分析物抗体或其片段。为了形成所述混合物而加入测试样品和第一特异性结合配偶体的次序不是关键性的。优选地，所述第一特异性结合配偶体固定化在固相上。在免疫测定中使用的固相（用于第一特异性结合配偶体，和任选地，第二特异性结合配偶体）可以是本领域中已知的任何固相，例如，但不限于、磁性颗粒、珠子、纳米珠子、微米珠子、纳米颗粒、微粒、膜、支架分子、薄

膜、滤纸、圆盘或芯片(例如,微流体芯片)。

[0363] 形成含有第一特异性结合配偶体-目标分析物复合物的混合物以后,使用本领域中已知的任何技术从所述复合物除去任何未结合的目标分析物。例如,通过洗涤可以除去未结合的目标分析物。但是,理想地,第一特异性结合配偶体比存在于测试样品中的任何目标分析物过量地存在,使得存在于测试样品中的所有目标分析物被第一特异性结合配偶体结合。

[0364] 除去任何未结合的目标分析物以后,将第二特异性结合配偶体加入所述混合物中以形成第一特异性结合配偶体-目标分析物-第二特异性结合配偶体复合物。所述第二特异性结合配偶体优选地是结合目标分析物上的表位的抗-目标分析物抗体,所述表位不同于所述第一特异性结合配偶体结合的目标分析物上的表位。此外,也优选地,所述第二特异性结合配偶体含有可检测标记(例如,可切割的接头附接的标签,如上所述)或用其标记。

[0365] 固定化的抗体或其片段的应用可以整合在免疫测定中。所述抗体可以固定化在多种支持物上,诸如磁性或色谱基体颗粒、胶乳颗粒或改性的表面胶乳颗粒、聚合物或聚合物薄膜、塑料或塑料薄膜、平面基底、微流体表面、固体基底材料的碎片等。

[0366] b) 夹心免疫测定

夹心免疫测定测量两个抗体层(即,捕获抗体(即至少一种捕获抗体)和检测抗体(即至少一种检测抗体))之间的抗原的量。捕获抗体和检测抗体结合抗原(例如,目标分析物)上的不同表位。理想地,捕获抗体与表位的结合不会干扰检测抗体与表位的结合。单克隆或多克隆抗体可以在夹心免疫测定中用作捕获抗体和检测抗体。

[0367] 通常,采用至少两种抗体来分离和定量测试样品中的目标分析物。更具体地,所述至少两种抗体结合形成免疫复合物(其被称作“夹心”)的目标分析物的某些表位或目标分析物片段。一种或多种抗体可以用于捕获测试样品中的目标分析物(这些抗体经常被称作“捕获”抗体),且一种或多种也结合目标分析物的具有可检测标记(例如,与可切割的接头附接的标签)的抗体可以用于完成夹心(这些抗体经常被称作“检测”抗体或“检测”抗体)。在某些实施方案中,适体可以用作第二结合成员并可以充当可检测的标签。在夹心测定中,测定中的任意其它抗体与它各自表位的结合理想地不会减少抗体与它的表位的结合。换言之,选择抗体,使得与疑似含有目标分析物的测试样品发生接触的一种或多种第一抗体不会结合被第二或随后抗体识别的全部或部分表位,由此干扰一种或多种第二检测抗体的结合目标分析物的能力。

[0368] 在一个优选的实施方案中,疑似含有目标分析物的测试样品可以同时或依次与至少一种捕获抗体和至少一种检测抗体接触。在夹心测定形式中,首先使疑似含有目标分析物(膜相关的目标分析物、可溶性的目标分析物、膜相关的目标分析物的片段、可溶性的目标分析物的片段、目标分析物(膜相关的或可溶性的目标分析物)的变体或其任意组合)的测试样品与至少一种捕获抗体接触,所述捕获抗体在允许形成抗体-目标分析物复合物的条件下特异性地结合特定表位。如果使用超过一种捕获抗体,形成多种捕获抗体-目标分析物复合物。在夹心测定中,以相对于在测试样品中预见到的目标分析物或目标分析物片段的最大量摩尔过量的量使用抗体,优选地,至少一种捕获抗体。

[0369] 任选地,在使测试样品与至少一种第一捕获抗体接触之前,所述至少一种捕获抗体可以结合至促进抗体-目标分析物复合物从测试样品分离的固体支持物。可以使用本领域

域中已知的任何固体支持物,包括、但不限于,呈平面基底或珠子等形式的由聚合物材料制成的固体支持物。使用化学偶联剂或通过本领域中已知的其它方式,通过吸附、通过共价键合,可以使所述抗体结合至固体支持物,前提条件是,这样的结合不会干扰所述抗体的结合目标分析物或目标分析物片段的能力。此外,如果必要的话,可以将固体支持物衍生化以允许与所述抗体上的各种官能团的反应性。这样的衍生化需要使用某些偶联剂,例如,但不限于,马来酸酐、N-羟基琥珀酰亚胺、叠氮基、炔基和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺。

[0370] 使疑似含有目标分析物的测试样品与至少一种捕获抗体接触以后,将测试样品温育以便允许形成捕获抗体-目标分析物复合物。所述温育可以在约4.5至约10.0的pH、在约2℃至约45℃的温度进行,并持续至少约1分钟至约18小时、约2-6分钟或约3-4分钟的时间段。

[0371] 形成捕获抗体-目标分析物复合物以后,然后使所述复合物与至少一种检测抗体接触(在允许形成捕获抗体-目标分析物-检测抗体复合物的条件下)。如果使捕获抗体-目标分析物复合物与超过一种检测抗体接触,那么形成捕获抗体-目标分析物-检测抗体检测复合物。与捕获抗体一样,当使至少一种检测(和随后)抗体与捕获抗体-目标分析物复合物接触时,捕获抗体-目标分析物-检测抗体复合物的形成需要在与上述那些类似的条件下的温育时间段。优选地,至少一种检测抗体含有可检测标记(例如,与可切割的接头附接的标签)。在形成捕获抗体-目标分析物-检测抗体复合物之前、同时或之后,可检测标记可以结合至少一种检测抗体。可以使用本领域中已知的任何可检测标记,例如,如本文所讨论的可切割的接头,和本领域中已知的其它。

[0372] 为了形成测定混合物而加入测试样品和特异性结合配偶体的次序不是关键性的。如果第一特异性结合配偶体被可检测地标记(例如,与可切割的接头附接的标签),那么形成可检测地标记的第一特异性结合配偶体-目标分析物复合物。可替换地,如果使用第二特异性结合配偶体且所述第二特异性结合配偶体被可检测地标记(例如,与可切割的接头附接的标签),那么形成可检测地标记的第一特异性结合配偶体-目标分析物-第二特异性结合配偶体的复合物。使用本领域已知的任何技术,诸如洗涤,可以从混合物除去任何未结合的特异性结合配偶体,无论是标记的还是未标记的。

[0373] 接着,产生信号,其指示目标分析物或其片段的存在。基于产生的信号参数,可以定量样品中目标分析物的量。任选地,通过质谱法、比重测定方法和本领域已知的其它技术,可以使用已知浓度的目标分析物的系列稀释物或溶液产生标准曲线。

[0374] c) 正向竞争性抑制

在正向竞争形式中,使用已知浓度的经标记的目标分析物(例如,具有与可切割的接头附接的标签的分析物)的等分试样与测试样品中的目标分析物竞争对目标分析物抗体的结合。

[0375] 在正向竞争测定中,可以使固定化的特异性结合配偶体(诸如抗体)依次或同时与测试样品和经标记的目标分析物、其目标分析物片段或目标分析物变体接触。目标分析物肽、目标分析物片段或目标分析物变体可以用任何可检测标记进行标记,包括包含与可切割的接头附接的标签的可检测标记。在该测定中,所述抗体可以固定化在固体支持物上。可替换地,所述抗体可以偶联到已经固定化在固体支持物(诸如微粒或平面基底)上的抗体,

诸如抗物种抗体。

[0376] 本文中提供了用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括：使所述样品与结合成员接触，其中所述结合成员被固定化在固体支持物上，且其中所述结合成员特异性地结合所述分析物；使所述样品与经标记的分析物接触，所述样品可能含有与所述结合成员结合的分析物，其中所述经标记的分析物用可切割标签标记；除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物；切割标签，所述标签附接到与所述结合成员结合的经标记的分析物；穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述被切割的标签；和评估穿过所述层转移的标签，其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，或检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中，对测量穿过所述层转移的标签进行评估，其中穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中，对检测穿过所述层转移的标签进行评估，其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0377] 本文中提供了用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括：使所述样品与结合成员接触，其中结合成员被固定化在固体支持物上，且其中结合成员特异性地结合所述分析物；使所述样品与经标记的分析物接触，所述样品可能含有与所述结合成员结合的分析物，其中所述经标记的分析物包含适体；除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物；解离适体，所述适体结合至与所述结合成员结合的经标记的分析物，并穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体；和评估穿过所述层转移的适体，其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，或检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中，对测量穿过所述层转移的适体进行评估，其中穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中，对检测穿过所述层转移的适体进行评估，其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0378] 在与上面关于夹心测定形式描述的那些类似的条件下温育经标记的目标分析物、测试样品和抗体。然后可以产生两种不同的抗体-目标分析物复合物。具体地，产生的抗体-目标分析物复合物之一含有可检测标记（例如，标签），而其它抗体-目标分析物复合物不含有可检测标记。在定量可检测标记之前，所述抗体-目标分析物复合物可以、但是不一定与测试样品的剩余部分分离。不论抗体-目标分析物复合物是否与测试样品的剩余部分分离，然后定量抗体-目标分析物复合物中的可检测标记的量。然后可以确定在测试样品中的目标分析物（诸如膜相关的目标分析物、可溶性的目标分析物、可溶性的目标分析物的片段、目标分析物（膜相关的或可溶性的目标分析物）的变体或其任意组合）的浓度，例如，如上所述。如果有益的话，通过将抗体-目标分析物复合物中的可检测标记的量与标准曲线进行对比，可以进行确定。使用已知浓度的目标分析物（诸如膜相关的目标分析物、可溶性的目标分析物、可溶性的目标分析物的片段、目标分析物（膜相关的或可溶性的目标分析物）的变体或其任意组合）的系列稀释物可以产生标准曲线，其中通过质谱法、比重测定法和通过本领域已知的其它技术确定浓度。

[0379] 任选地，可以如下将抗体-目标分析物复合物与测试样品分离：使所述抗体结合固体支持物，诸如上面关于夹心测定形式讨论的固体支持物，并然后从与固体支持物的接触除去测试样品的剩余部分。

[0380] d) 反向竞争测定

在反向竞争测定中,固定化的目标分析物可以依次或同时接触测试样品和至少一种标记的抗体。

[0381] 本文中提供了用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员用可切割标签标记;使所述样品与固定化的分析物接触,所述样品可能含有与所述结合成员结合的分析物,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;切割标签,所述标签附接到与所述固定化的分析物结合的结合成员;穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述被切割的标签;和评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的标签进行评估,其中穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对检测穿过所述层转移的标签进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0382] 本文中提供了用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法。所述方法包括:使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员包含适体;使所述样品与固定化的分析物接触,所述样品可能含有与所述结合成员结合的分析物,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;解离适体,所述适体结合至与所述固定化的分析物结合的结合成员,并穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。在某些实施方案中,对测量穿过所述层转移的适体进行评估,其中穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量。在某些实施方案中,对检测穿过所述层转移的适体进行评估,其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0383] 目标分析物可以结合至固体支持物,诸如上面关于夹心测定形式讨论的固体支持物。

[0384] 在与上面关于夹心测定形式描述的那些类似的条件下温育固定化的目标分析物、测试样品和至少一种标记的抗体。然后产生两种不同的目标分析物-抗体复合物。具体地,产生的目标分析物-抗体复合物之一被固定化且含有可检测标记(例如,与可切割的接头附接的标签),而其它目标分析物-抗体复合物没有固定化且含有可检测标记。通过本领域已知的技术,诸如洗涤,从固定化的目标分析物-抗体复合物的存在除去未固定化的目标分析物-抗体复合物和测试样品的剩余部分。一旦除去未固定化的目标分析物抗体复合物,然后在切割所述标签以后定量固定化的目标分析物-抗体复合物中的可检测标记的量。然后通过如上所述对比可检测标记的量来确定测试样品中的目标分析物的浓度。如果有益的话,这可以使用标准曲线完成。使用已知浓度的目标分析物或目标分析物片段的系列稀释物可以产生标准曲线,其中通过质谱法、比重测定法和通过本领域已知的其它技术确定浓度。

[0385] e) 一步免疫测定或运行中捕获测定

在一步免疫测定或运行中捕获测定中,用固定化试剂预包被固体基底。将捕获剂、分析物和检测剂一起加入固体基底,继之以在检测前的洗涤步骤。捕获剂可以结合分析物且包含固定化试剂的配体。捕获剂和检测剂可以是抗体或本文描述的或本领域已知的能够捕获或检测的任意其它部分。所述配体可以包含肽标签,且所述固定化试剂可以包含抗-肽标签抗体。可替代地,所述配体和所述固定化试剂可以是能够结合在一起从而用于运行中捕获测定的任何试剂对(例如,特异性结合对和其它,诸如本领域已知的)。可以测量超过一种分析物。在某些实施方案中,可以用抗原包被固体基底,且要分析的分析物是抗体。

[0386] 在某些实施方案中,使用用固定化试剂(诸如生物素、抗生蛋白链菌素等)预包被的固体支持物(诸如微粒)和至少第一特异性结合成员和第二特异性结合成员(其分别作为捕获试剂和检测试剂起作用)。第一特异性结合成员包含固定化试剂的配体(例如,如果在固体支持物上的固定化试剂是抗生蛋白链菌素,在第一特异性结合成员上的配体可以是生物素)且也结合目标分析物。第二特异性结合成员包含可检测标记且结合目标分析物。可以将固体支持物和第一和第二特异性结合成员加入测试样品(依次或同时)。在第一特异性结合成员上的配体结合固体支持物上的固定化试剂以形成固体支持物/第一特异性结合成员复合物。存在于样品中的任何目标分析物结合固体支持物/第一特异性结合成员复合物以形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物。第二特异性结合成员结合固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物,并检测可检测标记。在检测之前可以采用任选的洗涤步骤。在某些实施方案中,在一步测定中,可以测量超过一种分析物。在某些其它实施方案中,可以采用超过两种特异性结合成员。在某些其它实施方案中,可以加入多种可检测标记。在某些其它实施方案中,可以检测多种目标分析物。

[0387] 一步免疫测定或运行中捕获测定的应用可以以本文中描述的和本领域已知的多种形式进行。例如所述形式可以是夹心测定诸如上述,但是可替代地可以是竞争测定,可以采用单个特异性结合成员,或使用其它变体诸如已知的。

[0388] f) 组合测定(用Ag/Ab共包被微粒)

在组合测定中,将固体基底(诸如微粒)用抗原和抗体共包被以分别从样品捕获抗体和抗原。可以将固体支持物用两种或更多种不同抗原共包被以从样品捕获两种或更多种不同抗体。可以将固体支持物用两种或更多种不同抗体共包被以从样品捕获两种或更多种不同抗原。

[0389] 另外,本文所述的方法可以使用封闭剂阻止测定化合物之间的特异性的或非特异性的结合反应(例如,HAMA参与)。一旦所述试剂(和任选地,任何对照)被固定化在支持物上,可以在所述支持物上封闭所述试剂的剩余结合位点。可以使用本领域普通技术人员已知的任意合适的封闭剂。例如,可以采用牛血清白蛋白(“BSA”)、酪蛋白在PBS中的磷酸盐缓冲液(“PBS”)溶液、Tween 20™ (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.)或其它合适的表面活性剂,以及其它封闭剂。

[0390] 从本发明会明白,本文公开的方法和装置(包括变体)可以用于诊断疑似具有疾病、障碍或病症的受试者中的疾病、障碍或病症。例如,所述样品分析可以用于检测疾病标志物,例如,癌症标志物、心脏病症的标志物、毒素、病原体,例如,病毒、细菌或其部分。所述方法和装置也可以用于测量存在于生物样品中的分析物。所述方法和装置还可以用在血液筛查测定中以检测靶分析物。所述血液筛查测定可以用于筛查血液供给。

[0391] 6. 计数和数据分析

使用本领域已知的任何常规技术可以定性地或定量地确定转移事件的数目。在某些实施方案中,通过首先使用以下方程式计算在实验性测试条件下在双链DNA转移事件中发现的预期电流变化,可以确定转移事件的数目:

$$\Delta G = \frac{\sigma \pi d_{DNA}^2}{4L} \quad (S1),$$

如在Kwok等人,“Nanopore Fabrication by controlled Dielectric Breakdown” Supplementary Information第8部分和Kwok, H.; Briggs, K.;和Tabard-Cossa, V.; “Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown”- PLoS ONE 9(3): e92880 (2014)中引用的。使用该预期电流阻断值,可以针对可接受的预期电流阻断事件在视觉上或手工地扫描实验性纳米孔输出的二进制文件数据。使用这些事件,可以应用和执行CUSUM纳米孔软件所需的阈值(Threshold)和滞后(Hysteresis)参数。使用cusumtools readevents.py软件并过滤大于1000 pA的阻断事件(如从第一次计算确定的),可以进一步分析来自该软件的输出。可以从readevents.py分析工具确定通量事件、事件之间的时间和其它计算。使用JMP软件(SAS Institute, Cary, North Carolina)可以对CUSUM产生的数据做出另外计算。可以使用本领域已知的用于数据分析的其它阈值设定方法。

[0392] 7. 定性分析

使用本文所述的方法和步骤过程可以进行定性测定。使用可切割的接头缀合物可以进行直接测定,如在实施例17中所述,具有基于巯基的切割步骤,如在图25中所示。应当理解,用于进行这样的测定的其它可切割的接头方案还可以包括、但不限于多种切割接头的其它方法,从而允许计数如本文所述的各种标签。另外,可以采用适体。例如,除了在实施例17中描述的方法以外,这样的其它替代切割方法和/或试剂可以包括在实施例16、实施例18、实施例19、实施例20和实施例21中描述的那些,以及本文描述的和本领域技术人员已知的其它切割方法。还理解,尽管在本实施例(实施例24)中证实的测定形式代表直接测定,但是使用所述的方法同样可以实现其它形式诸如夹心免疫测定形式和/或各种竞争性测定形式(且包括运行中捕获形式,诸如本领域技术人员已知的)来进行测定。

[0393] 例如,如在实施例9中所述的用于检测TSH(促甲状腺激素)的夹心免疫测定形式表现出在低成本DMF芯片上进行这样的测定的能力。另外,使用多种异双官能的、可切割的接头诸如在实施例1、实施例2、实施例3、实施例4、实施例5和实施例6中描述的那些,以及本领域技术人员以其它方式已知的其它可切割的接头,可以合成许多不同的生物缀合试剂,其可以用于产生免疫缀合物或具有可切割的接头的其它有活性的特异性结合成员。通过方法诸如在实施例3、实施例4、实施例5和实施例6中描述的那些,以及通过本领域技术人员已知的其它方法,可以合成可用于实践本发明的免疫缀合物。另外,实施例8显示了在低成本芯片上的各种流体微滴操作的功能性,其可以促进进行各种测定形式所需的各种步骤,所述测定形式包括夹心和竞争性测定形式,且包括运行中捕获形式,以及本领域技术人员已知的它们的其它变体。实施例11显示了纳米孔的制造,其可以用于在测定中计数可切割标记,但是应当理解,本领域技术人员已知的用于纳米孔制造的其它方法也可以用于该目的。实施例16也代表可用于进行测定的另一种构建体,在其中实现切割,从而导致可计数的标记被

释放,从而可使用在该实施例内所述的纳米孔计数方法计数。该构建体和本领域技术人员会明白的其它构建体可以用在本文所述的测定中。

[0394] 实施例22显示了通常可以如何进行计数从而能够测量与穿过纳米孔的多种标记的存在有关的转移事件。图29显示了信号阈值的概念,从而能够操纵计数测定中数据的特性。图28显示了定性测定数据,其代表使用在该实施例内描述的这类测定方法可以用于确定分析物的存在的数据类型。还理解,尽管在该特定实施例中将dsDNA用作标记,还可以利用其它标记,诸如在实施例5和/或实施例22中描述的标记,包括、但不限于纳米珠子、树枝状聚合物等。此外,也可以采用其它已知标记。通过在本申请中本文描述的各种实施例或否则通过本领域技术人员已知的方法,可以合成产生适当试剂所需的这类构建体。

[0395] 8. 定量分析

使用如本文所述的方法和步骤过程可以进行定量测定。使用可切割的接头缀合物可以进行直接测定,如在实施例17中所述,具有基于巯基的切割步骤,且如在图25中所示。应当理解,进行这样的测定的其它可切割的接头方案还可以包括、但不限于接头的各种其它切割方法,从而允许使用纳米孔计数各种标签,如本文所述。另外,可以采用适体。例如,除了在实施例17中描述的方法以外,这样的其它切割方法可以包括、但不限于在实施例18、实施例19、实施例20和实施例21中描述的那些,以及本文描述的和本领域技术人员已知的其它方法。还理解,尽管在本实施例(实施例25)中证实的测定形式代表直接测定,但是同样可以实现其它形式诸如夹心免疫测定形式和/或各种竞争性测定形式(且包括运行中捕获形式,诸如本领域技术人员已知的)来进行测定。

[0396] 例如,如在实施例9中所述的用于检测TSH(促甲状腺激素)的夹心免疫测定形式表现出在低成本DMF芯片上进行这样的测定的能力。另外,使用多种异双官能的可切割的接头和通过方法(诸如在实施例1、实施例2、实施例3、实施例4、实施例5和实施例6中描述的那些)合成的缀合物,以及通过本领域技术人员已知的方法可以合成的其它可切割的接头或缀合物,本领域技术人员可以合成许多不同的生物缀合试剂,其可以用于产生免疫缀合物或具有可切割的接头的其它有活性的特异性结合成员。另外,实施例8显示了在低成本芯片上的各种流体微滴操作的功能性,其可以促进进行各种测定形式所需的各种步骤,所述测定形式包括夹心和竞争性测定形式,且包括运行中捕获形式,以及本领域技术人员已知的它们的其它变体。实施例16也代表可用于进行测定的另一种构建体,在其中实现切割,从而导致可计数的标记被释放,从而可使用在该实施例内所述的纳米孔计数方法计数。该构建体以及本领域技术人员会明白的其它构建体可以用在本文所述的测定中。

[0397] 实施例22显示了通常可以如何进行计数从而能够测量与穿过纳米孔的标记的存在有关的转移事件。图29显示了信号阈值的概念,从而能够操纵计数测定中数据的特性。图31、32和33显示了定量测定数据输出,其代表使用在该实施例内描述的这类测定方法可以用于确定分析物的量的数据类型。图34显示了从已经使用化学方法切割的构建体产生的标准曲线。还理解,尽管在该特定实施例中将dsDNA用作标记,还可以利用其它标记,诸如在实施例5中描述的标记,包括、但不限于纳米珠子、树枝状聚合物等。此外,也可以采用其它已知标记。如本文中所述,或通过本领域技术人员已知的方法,可以合成产生适当试剂所需的这类构建体。

[0398] 9. 试剂盒和筒

本文中还提供了一种或不用公开的装置执行上述方法的试剂盒。所述试剂盒可以包括关于用公开的装置分析分析物的说明书。在试剂盒中包括的说明书可以附连到包装材料,或可以作为包装说明书来包含。所述说明书可以是书写的或印刷的材料,但不限于此。本发明预见到能够存储这样的说明书并将它们传递给最终使用者的任何介质。这样的介质包括,但不限于电子存储介质(例如,磁盘、磁带、筒、芯片)、光学介质(例如,CD ROM)等。本文中使用的“说明书”可以包括提供所述说明书的因特网站点的地址。

[0399] 所述试剂盒可以包括筒,所述筒包括具有嵌入式纳米孔模块的微流体模块,如上所述。在某些实施方案中,微流体和纳米孔模块可以是用于可逆地集成在一起的单独部件,或可以完全地或不可逆地集成在筒中。所述筒可以是一次用弃的。所述筒可以包括一种或多种可用于实践上面公开的方法的试剂。所述筒可以包括一个或多个容器,所述容器容纳所述试剂作为一种或多种单独的组合物,或者任选地,在试剂的相容性将允许的情况下,作为混合物。所述筒还可以包括从用户观点看可能希望的其它材料,诸如缓冲液、稀释剂、标准品(例如,校准物和对照)和/或可用于样品处理、洗涤或进行测定的任意其它步骤的任意其它材料。所述筒可以包括上述的特异性结合成员中的一种或多种。

[0400] 可替换地或额外地,所述试剂盒可以包含校准物或对照,例如,经纯化的和任选地冻干的目标分析物,或呈在筒上或单独的液体、凝胶或其它形式,和/或至少一个用于与上述装置和方法一起使用的容器(例如,试管、微孔滴定板或条带),和/或缓冲液,诸如测定缓冲液或洗涤缓冲液,其中任一种可以提供为浓缩的溶液。在某些实施方案中,所述试剂盒包含执行测定必需的所有组分,即试剂、标准品、缓冲液、稀释剂等。所述说明书还可以包括关于制作标准曲线的说明书。

[0401] 所述试剂盒还可以包含用于定量目标分析物的参比标准。所述参比标准可以用于建立标准曲线以插入和/或外推目标分析物浓度。所述试剂盒可以包括在浓度水平方面变化的参比标准。例如,所述试剂盒可以包括具有高浓度水平、中浓度水平或低浓度水平的一种或多种参比标准。关于参比标准的浓度范围,这可以根据测定进行优化。参比标准的示例性浓度范围包括但不限于,例如:约10 fg/mL、约20 fg/mL、约50 fg/mL、约75 fg/mL、约100 fg/mL、约150 fg/mL、约200 fg/mL、约250 fg/mL、约500 fg/mL、约750 fg/mL、约1000 fg/mL、约10 pg/mL、约20 pg/mL、约50 pg/mL、约75 pg/mL、约100 pg/mL、约150 pg/mL、约200 pg/mL、约250 pg/mL、约500 pg/mL、约750 pg/mL、约1 ng/mL、约5 ng/mL、约10 ng/mL、约12.5 ng/mL、约15 ng/mL、约20 ng/mL、约25 ng/mL、约40 ng/mL、约45 ng/mL、约50 ng/mL、约55 ng/mL、约60 ng/mL、约75 ng/mL、约80 ng/mL、约85 ng/mL、约90 ng/mL、约95 ng/mL、约100 ng/mL、约125 ng/mL、约150 ng/mL、约165 ng/mL、约175 ng/mL、约200 ng/mL、约225 ng/mL、约250 ng/mL、约275 ng/mL、约300 ng/mL、约400 ng/mL、约425 ng/mL、约450 ng/mL、约465 ng/mL、约475 ng/mL、约500 ng/mL、约525 ng/mL、约550 ng/mL、约575 ng/mL、约600 ng/mL、约700 ng/mL、约725 ng/mL、约750 ng/mL、约765 ng/mL、约775 ng/mL、约800 ng/mL、约825 ng/mL、约850 ng/mL、约875 ng/mL、约900 ng/mL、约925 ng/mL、约950 ng/mL、约975 ng/mL、约1000 ng/mL、约2 μ g/mL、约3 μ g/mL、约4 μ g/mL、约5 μ g/mL、约6 μ g/mL、约7 μ g/mL、约8 μ g/mL、约9 μ g/mL、约10 μ g/mL、约20 μ g/mL、约30 μ g/mL、约40 μ g/mL、约50 μ g/mL、约60 μ g/mL、约70 μ g/mL、约80 μ g/mL、约90 μ g/mL、约100 μ g/mL、约200 μ g/mL、约300 μ g/mL、约400 μ g/mL、约500 μ g/mL、约600 μ g/mL、约700 μ g/mL、约800 μ g/mL、约900 μ g/mL、约1000 μ g/mL、约2000 μ

g/mL、约3000 μ g/mL、约4000 μ g/mL、约5000 μ g/mL、约6000 μ g/mL、约7000 μ g/mL、约8000 μ g/mL、约9000 μ g/mL或约10000 μ g/mL。

[0402] 在试剂盒中提供的任何特异性结合成员可以包含标签或标记,诸如荧光团、酶、适体、树枝状聚合物、珠子、纳米颗粒、微粒、聚合物、蛋白、生物素/抗生物素蛋白标记等,或所述试剂盒可以包括用于标记特异性结合成员的试剂、或用于检测特异性结合成员和/或用于标记分析物的试剂、或用于检测分析物的试剂。如果需要的话,所述试剂盒可以含有一种或多种不同标签或标记。所述试剂盒还可以包括引起切割的组分,诸如介导切割的试剂。例如,介导切割的试剂可以包括还原剂,诸如二硫苏糖醇(DTT)或三(2-羧基乙基)膦(TCEP)。特异性结合成员、校准物和/或对照可以提供在单独容器中或预分配在适当的测定形式或筒中。使用公开的装置可以检测所述标签。

[0403] 所述试剂盒可以包括一种或多种特异性结合成员,例如,以在多路复用测定中检测样品中的一种或多种靶分析物。所述试剂盒中不同类型的特异性结合成员的数目可以随所述试剂盒的预期用途宽泛地变化。所述试剂盒中特异性结合成员的数目可以在1种至约10种的范围内或更高。例如,所述试剂盒可以包括1-10种特异性结合成员、1-9种特异性结合成员、1-8种特异性结合成员、1-7种特异性结合成员、1-6种特异性结合成员、1-5种特异性结合成员、1-4种特异性结合成员、1-3种特异性结合成员、1-2种特异性结合成员、2-10种特异性结合成员、2-9种特异性结合成员、2-8种特异性结合成员、2-7种特异性结合成员、2-6种特异性结合成员、2-5种特异性结合成员、2-4种特异性结合成员、3-10种特异性结合成员、3-9种特异性结合成员、3-8种特异性结合成员、3-7种特异性结合成员、3-6种特异性结合成员、3-5种特异性结合成员、3-4种特异性结合成员、4-10种特异性结合成员、4-9种特异性结合成员、4-8种特异性结合成员、4-7种特异性结合成员、4-6种特异性结合成员、5-10种特异性结合成员、5-9种特异性结合成员、5-8种特异性结合成员、5-7种特异性结合成员、5-6种特异性结合成员、6-10种特异性结合成员、6-9种特异性结合成员、6-8种特异性结合成员、6-7种特异性结合成员、7-10种特异性结合成员、7-9种特异性结合成员、7-8种特异性结合成员、8-10种特异性结合成员、8-9种特异性结合成员或9-10种特异性结合成员。所述一种或多种特异性结合成员中的每一种可以结合不同的靶分析物,且每种特异性结合成员可以用不同的标签和/或适体标记。例如,所述试剂盒可以包括:结合第一靶分析物的第一特异性结合成员、结合第二靶分析物的第二特异性结合成员、结合第三靶分析物的第三特异性结合成员等,且所述第一特异性结合成员用第一标签和/或适体标记,所述第二特异性结合成员用第二标签和/或适体标记,所述第三特异性结合成员用第三标签和/或适体标记,等。除了一种或多种特异性结合成员以外,所述试剂盒还可以包含一种或多种另外的测定组分,诸如合适的缓冲介质,等。所述试剂盒还可以包括用于检测和测量标签和/或适体的装置,诸如上述的那些。最后,所述试剂盒可以包含关于在根据本发明的分析物检测方法中使用特异性结合成员的说明书,其中关于使用的这些说明书可以存在于试剂盒包装上和/或包装说明书上。

[0404] 任选地,所述试剂盒包括质量控制组分(例如,灵敏度实验对象组、校准物和阳性对照)。质量控制试剂的制备是本领域众所周知的,且描述在多种免疫诊断产品的插页上。灵敏度实验对象组成员任选地用于确立测定性能特征,且进一步任选地是试剂盒试剂的完整性和测定的标准化的有用指示剂。

[0405] 所述试剂盒还可以任选地包括进行诊断测定或便利质量控制评价所需的其它试剂,诸如缓冲液、盐、酶、酶辅因子、底物、检测试剂等。用于分离和/或处理测试样品的其它组分(诸如缓冲液和溶液)(例如,预处理试剂)也可以包括在试剂盒中。所述试剂盒可以另外包括一种或多种其它对照物。试剂盒的一种或多种组分可以被冻干,在该情况下,试剂盒可以进一步包含适合用于重构冻干的组分的试剂。所述组分中的一种或多种可以呈液体形式。

[0406] 所述试剂盒的各种组分任选地在必要时提供在合适的容器中。所述试剂盒还可以包括用于容纳或储存样品的容器(例如,用于尿、唾液、血浆、脑脊液或血清样品的容器或筒,或用于储存、运输或处理组织从而建立组织抽吸物的适当容器)。在适当的情况下,试剂盒任选地也可以含有反应容器、混合容器和促进试剂或测试样品的制备的其它组分。所述试剂盒还可以包括一个或多个用于辅助获得测试样品的样品收集/获取器械,诸如各种血液收集/转移装置诸如微取样装置、微针或其它最小侵袭性的无痛血液收集方法;血液收集试管;刺血针;毛细管血液收集试管;其它刺破单个指尖的血液收集方法;口腔拭子,鼻/喉拭子;16-号或其它尺寸的针,用于冲孔活组织检查的环形刀片(例如,1-8 mm或其它适当的尺寸),外科手术刀或激光(例如,特别是手持式),注射器,无菌容器,或插管,其用于得到、储存或抽吸组织样品;等。所述试剂盒可以包括一个或多个用于辅助关节抽吸、锥形活组织检查、冲孔活组织检查、细针抽吸活组织检查、图像引导的经皮针吸活组织检查、支气管肺泡灌洗、内窥镜活组织检查和腹腔镜活组织检查的器械。

[0407] 如果所述标签或可检测标记是或包括至少一种吡啶鎓化合物,所述试剂盒可以包含至少一种吡啶鎓-9-甲酰胺、至少一种吡啶鎓-9-甲酸芳基酯或它们的任意组合。如果所述标签或可检测标记是或包括至少一种吡啶鎓化合物,所述试剂盒还可以包含过氧化氢的来源,诸如缓冲液、溶液和/或至少一种碱性溶液。如果需要的话,所述试剂盒可以含有固相,诸如磁性颗粒、珠子、膜、支架分子、薄膜、滤纸、圆盘或芯片。

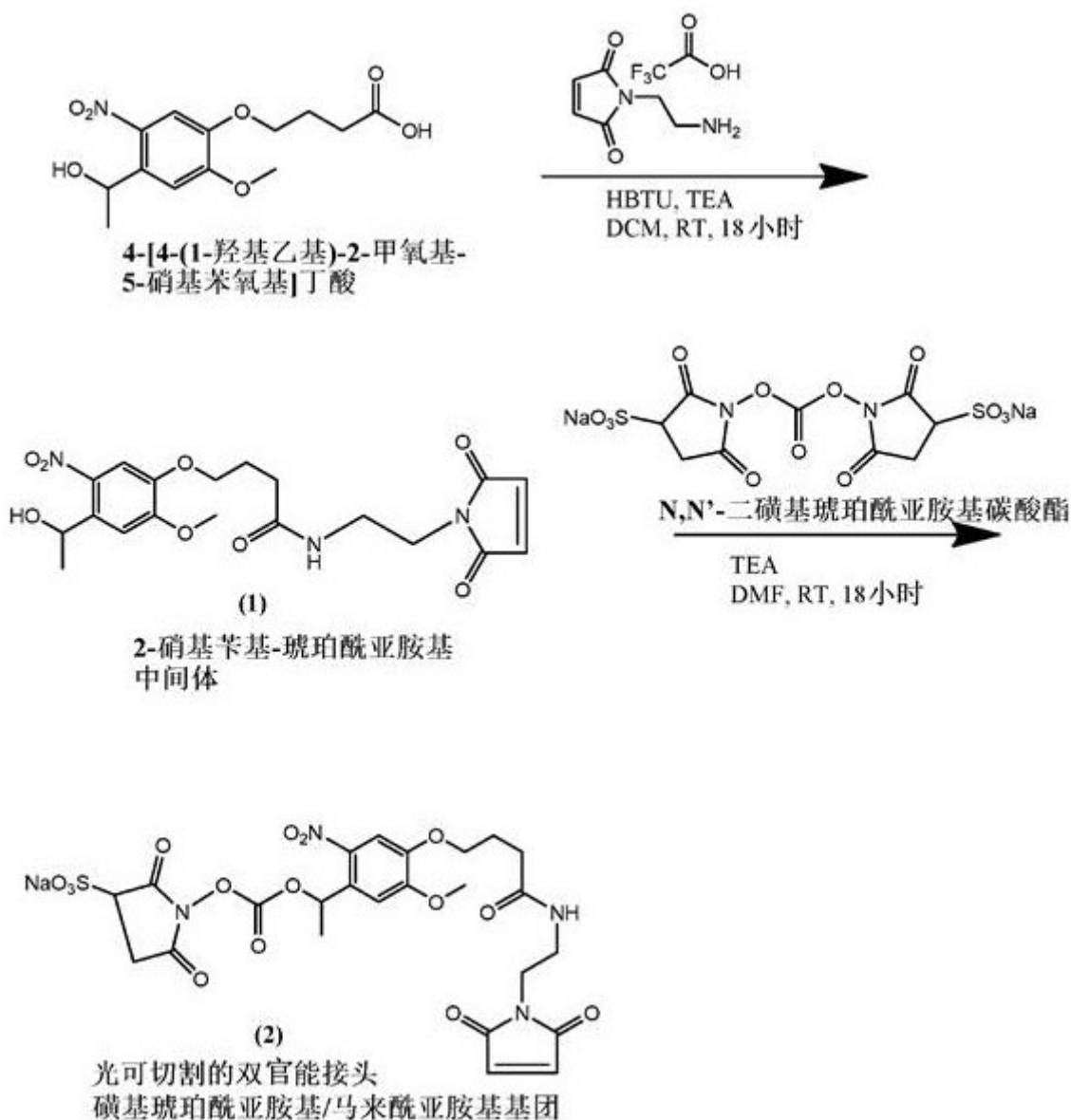
[0408] 如果需要的话,所述试剂盒可以进一步包含一种或多种组分,所述组分是单独的或与说明书进一步组合,所述组分用于针对另一种分析物测定测试样品,所述另一种分析物可以是生物标志物,诸如疾病状态或障碍(诸如传染性疾病、心脏疾病、代谢疾病、甲状腺疾病等)的生物标志物。

[0409] 本发明具有由下述非限制性实施例例证的多个方面。

[0410] 10. 实施例

实施例1

光可切割的2-硝基苄基琥珀酰亚胺基/马来酰亚胺基双官能接头的合成.



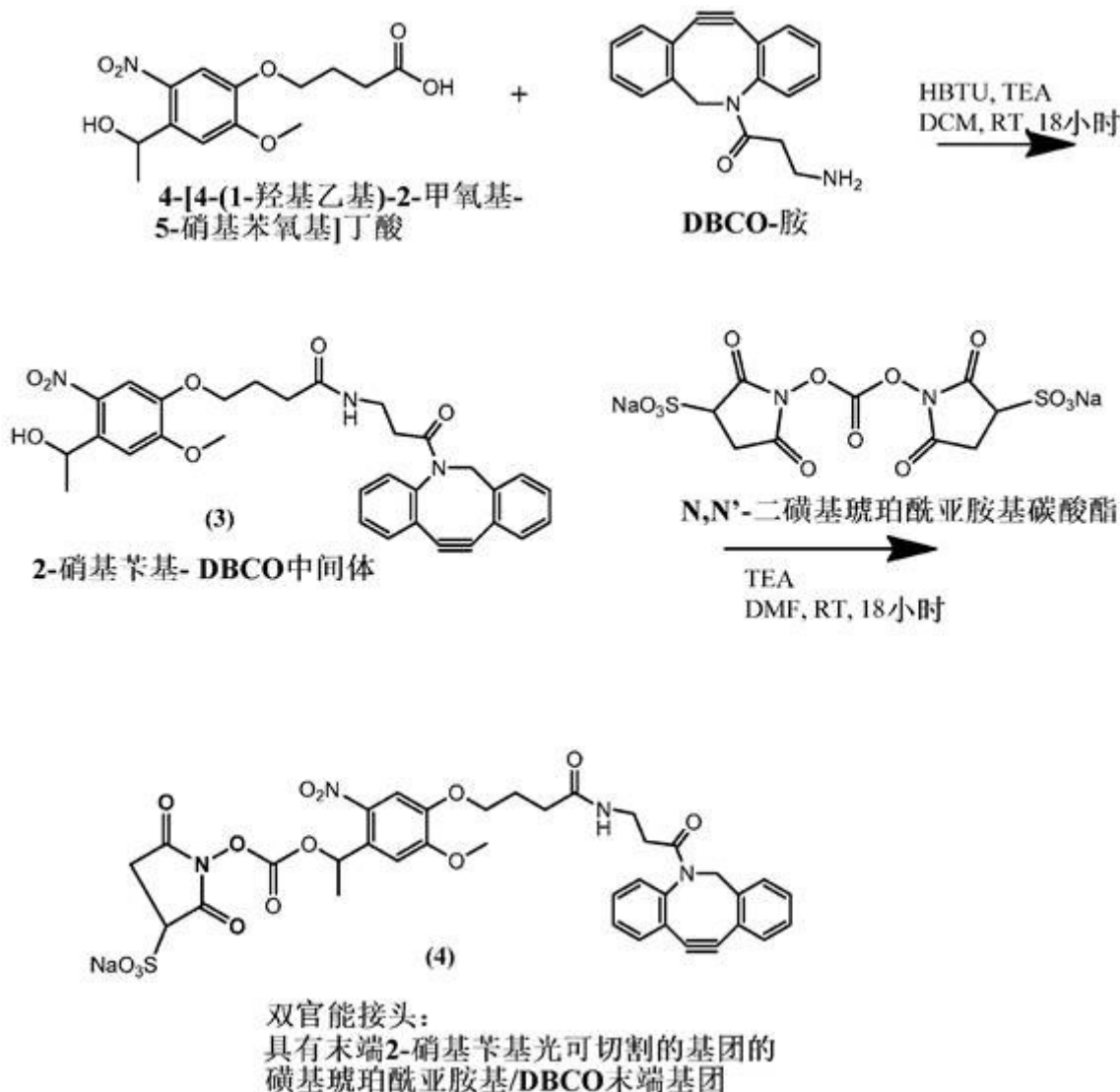
*在以上合成中,DMF是二甲基甲酰胺。

[0411] 化合物2的合成. 光可切割的磺基琥珀酰亚胺基/马来酰亚胺基接头的合成源自 Agasti, 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 134(45), 18499-18502, 2012。简而言之,在氩气氛下将起始原料4-[4-(1-羟基乙基)-2-甲氧基-5-硝基苯氧基]丁酸(0.334 mmol)溶解在无水二氯甲烷(DCM)中。通过将它置于冰浴中,将烧瓶冷却至0℃。将化合物2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)(0.368 mmol)和三甲胺(TEA)(0.835 mmol)加入溶液中。将反应混合物在0℃搅拌5 min,并随后加入N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺三氟乙酸盐(0.368 mmol)。在0℃搅拌15 min以后,使反应混合物升高至室温(RT)并进一步搅拌18 h。用DCM(45 ml)稀释反应混合物以后,将有机相用水(2x)、饱和NaCl溶液(1x)洗涤,并经硫酸钠干燥。将有机层在减压下浓缩并使用SiO₂柱通过快速色谱法(洗脱液: 100%DCM至3%的甲醇在DCM中的溶液, v/v)纯化。将化合物1(0.024 mmol)溶解在无水二甲基甲酰胺(1 ml)中。将N,N'-二磺基琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)(0.071 mmol)和TEA(0.096 mmol)接连地加入溶液中。将反应混合物在室温搅拌18 h。将反应混合物通过直接加载到C18反相柱上进行纯化(洗脱液: 5%的乙腈在水中的溶液至95%的乙腈在水中的溶液, v/v)。用于合成的起

始原料和其它化学物质可以购自Sigma-Aldrich。

[0412] 实施例2

光可切割的磺基琥珀酰亚胺基/DBCO 2-硝基苄基双官能接头的合成。



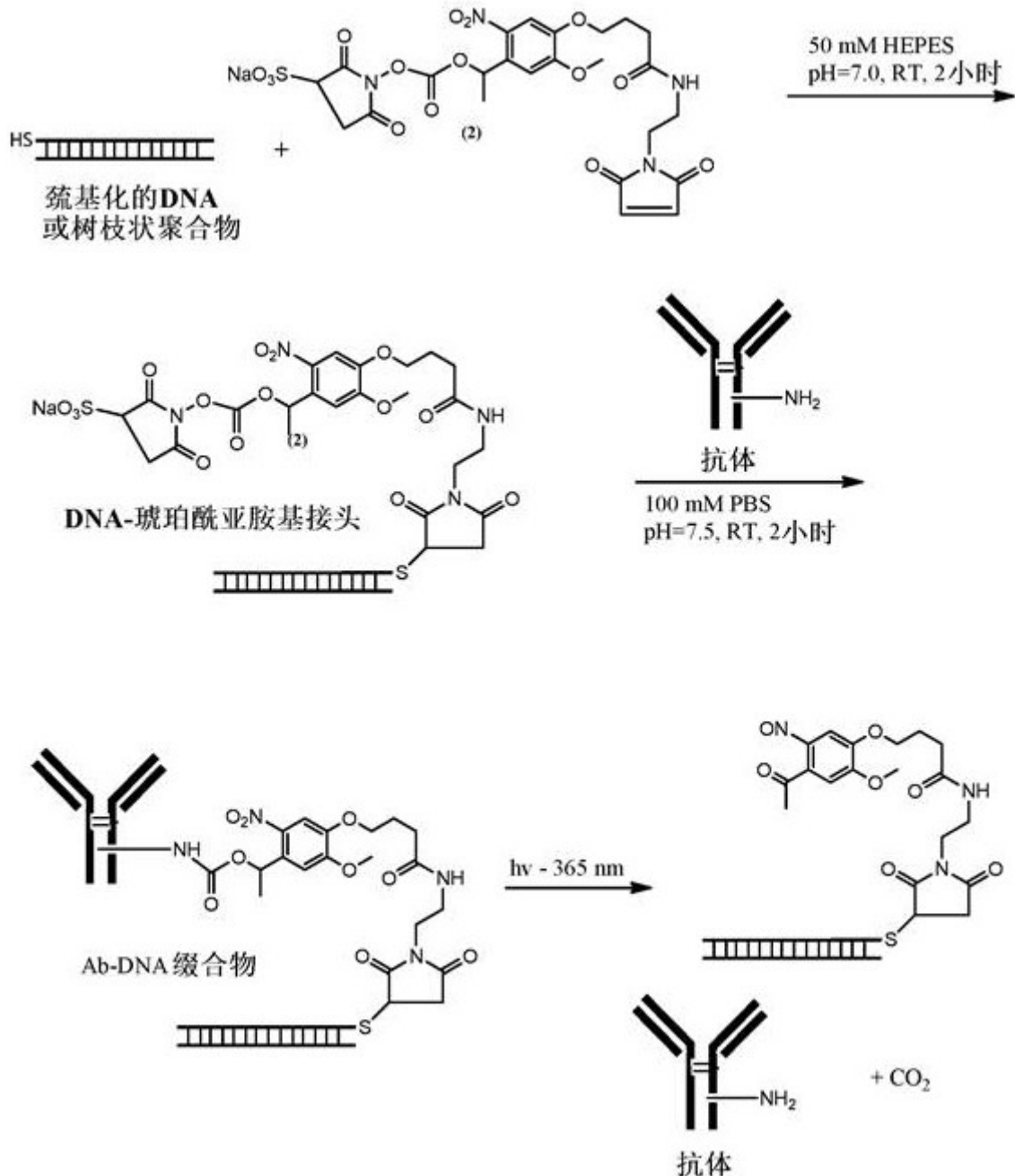
*在以上合成中,DMF是二甲基甲酰胺。

[0413] 化合物4的合成. 光可切割的磺基琥珀酰亚胺基/二苯并环辛基 (DBCO) 炔基接头的合成源自在Agasti, 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (45), 18499-18502, 2012中描述的类似操作. 简而言之, 在氩气氛下将起始原料4-[4-(1-羟基乙基)-2-甲氧基-5-硝基苯氧基]丁酸(0.334 mmol)溶解在无水二氯甲烷(DCM)中. 通过将它置于冰浴中, 将烧瓶冷却至0℃. 将化合物2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)(0.368 mmol)和三甲胺(TEA)(0.835 mmol)加入溶液中. 将反应混合物在0℃搅拌5 min, 随后加入DBCO-胺(0.368 mmol). 在0℃搅拌15 min以后, 使反应混合物升高至室温并进一步搅拌18 h. 用DCM(45 ml)稀释反应混合物以后, 将有机相用水(2x)、饱和NaCl溶液(1x)洗涤, 并经硫酸钠干燥. 将有机层在减压下浓缩并使用SiO₂柱通过快速色谱法(洗脱液: 100%DCM至3%的甲醇在DCM中的溶液, v/v)纯化. 将化合物3(0.024 mmol)溶解在无水二甲基甲酰胺(1 ml)中. 将N,N'-二磺基琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)(0.071 mmol)和TEA(0.096 mmol)接连地加

入溶液中。将反应混合物在室温搅拌18 h。将反应混合物通过直接加载到C18反相柱上进行纯化(洗脱液: 5%的乙腈在水中的溶液至95%的乙腈在水中的溶液, v/v)。用于合成的起始原料和其它化学物质可以购自Sigma-Aldrich。

[0414] 实施例3

使用碘基琥珀酰亚胺基/马来酰亚胺基2-硝基苄基双官能接头对抗体-DNA缀合物的偶联和光化学切割。



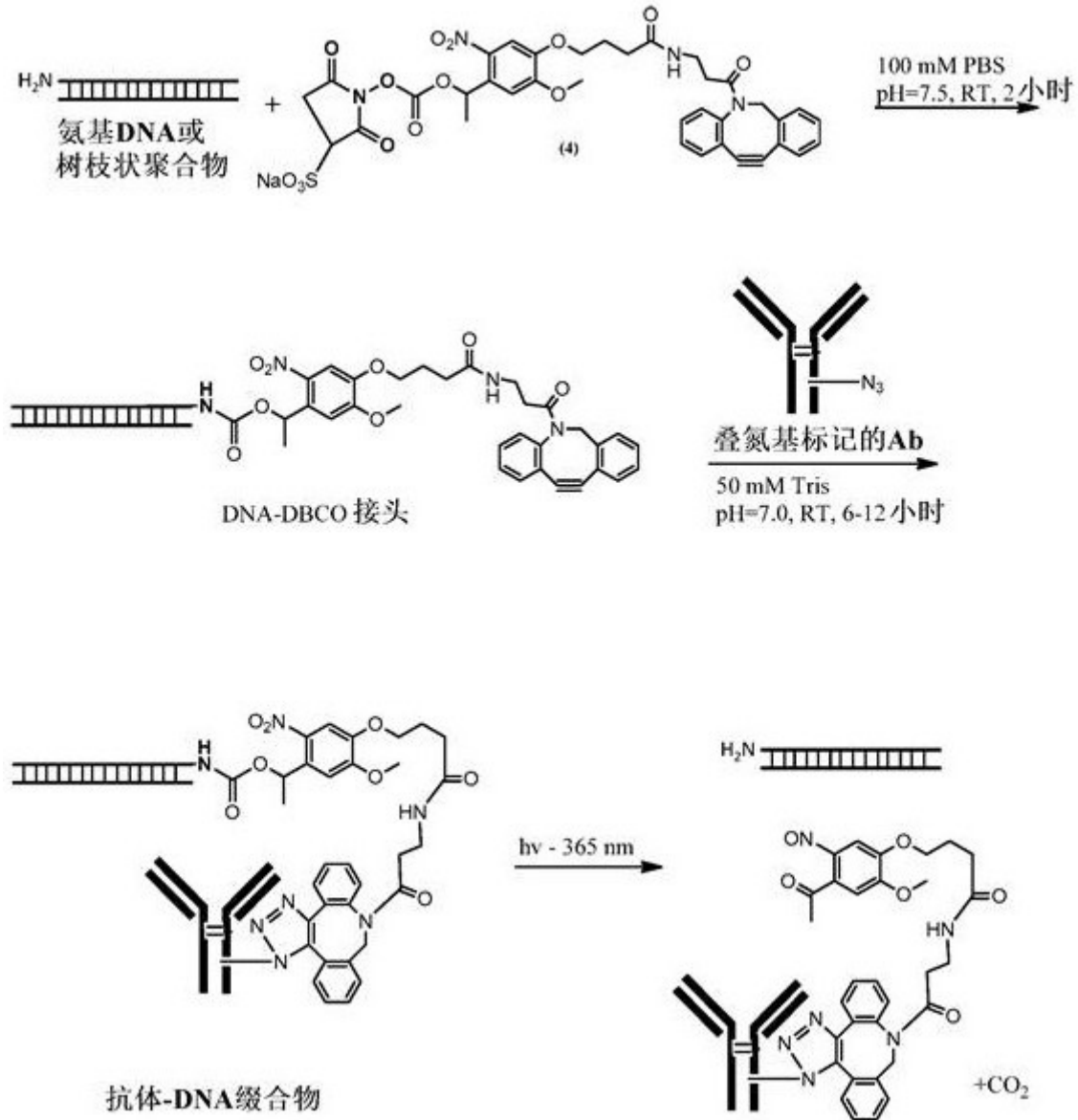
[0415] 抗体和DNA的生物缀合和切割. 使用下述方案可以将DNA分子缀合至抗体. 通过在使用两种PCR引物(其中一种或两种引物用5'-巯基标记)的PCR反应中复制DNA序列, 可以将DNA在5'末端处巯基化. 将经标记的DNA(100 μ M终浓度)在搅拌下溶解在50 mM HEPES (pH=7.0)中. 加入化合物2(2 mM), 并允许反应在室温进行2小时. 偶联以后, 将多余的未反应的马来酰亚胺基团用过量的二硫苏糖醇(DTT)淬灭. 将缀合物在凝胶过滤柱(Sephadex G-25)

上纯化,或通过在适当的缀合物储存缓冲液中在4℃充分透析进行纯化。将经纯化的DNA-琥珀酰亚胺基接头(50 μ M终浓度)在搅拌下溶解在100 mM PBS(pH=7.5)中。加入天然抗体(50 μ M终浓度)并允许反应在室温进行2小时。使用用100 mM PBS(pH 7.5)或BioGel P-30凝胶过滤介质运行的Sephadex柱(Sephadex G25)纯化Ab-DNA缀合物。

[0416] 在纳米孔检测之前,可以通过用紫外灯在365 nm照射来切割缀合物。使用相同的生物缀合化学,该实施例也可以用在DNA树枝状聚合物上。

[0417] 实施例4

使用磺基琥珀酰亚胺基/DBCO 2-硝基苄基双官能接头对抗体-DNA缀合物的偶联和光化学切割。



抗体和DNA的生物缀合和切割。使用下述方案可以将DNA分子缀合至抗体。通过在使用两种PCR引物(其中一种或两种引物用5'-胺基标记)的PCR反应中复制DNA序列,可以将DNA在5'末端处胺化。将经标记的DNA(100 μ M终浓度)在搅拌下溶解在100 mM PBS(pH=7.5)中。加入化合物4(2 mM终浓度)并允许反应在室温进行2小时。将DNA-DBCO接头在凝胶过滤柱(Sephadex G-25)上纯化,或通过在适当的缀合物储存缓冲液中在4℃充分透析进行纯化。

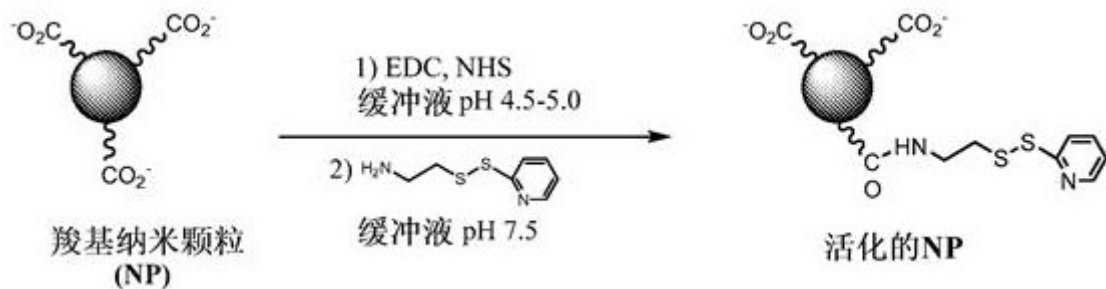
将经纯化的DNA-DBCO接头(50 μ M终浓度)在搅拌下溶解在50 mM Tris(pH=7.0)中。使用无铜点击化学将DNA-DBCO接头偶联至所述抗体。加入叠氮基标记的抗体(Kazane等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109(10), 3731-3736, 2012)(25 μ M终浓度)并允许反应在室温进行6-12小时。使用用100 mM PBS(pH 7.5)或BioGel P-30凝胶过滤介质运行的Sephadex柱(Sephadex G25)纯化Ab-DNA缀合物。

[0418] 在纳米孔检测之前,可以通过用紫外灯在365 nm照射来切割缀合物。使用相同的生物缀合化学,该实施例也可以用在DNA树枝状聚合物上。

[0419] 实施例5

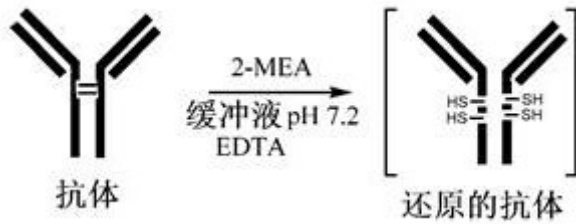
用于数字免疫测定(纳米孔计数)的纳米颗粒-抗体缀合物。

本实施例描述了抗体与26 nm羧基化的聚苯乙烯纳米颗粒(NP, PC02N)(诸如可以从Bangs Labs(Fishers, IN, USA)得到的那些)的共价缀合。26 nm NP具有528.7 μ eq/g的表面电荷和68.4平方 \AA /组的停靠面积(按照生产商信息)。

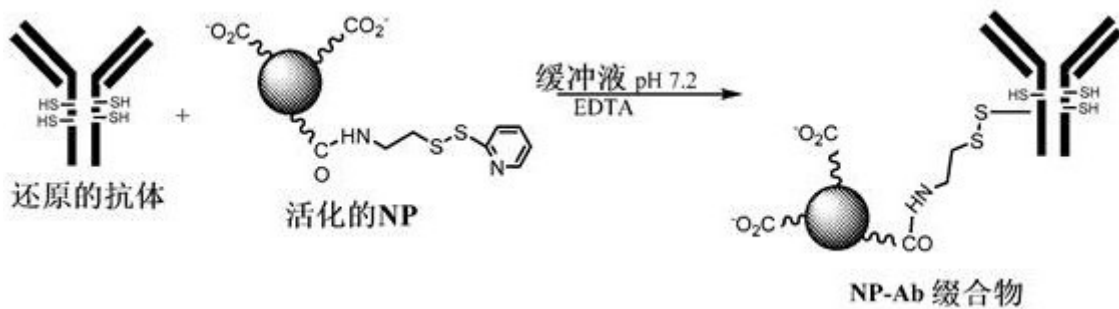


[0420] 羧基-聚苯乙烯纳米颗粒的活化:将1.0 mL(100 mg/mL)的26 nm羧基化的NP用10 mL的0.1M MES(2-[N-吗啉代]乙烷磺酸)(pH 4.5-5.0)洗涤。洗涤以后,将沉淀物再悬浮于100 mL的0.1M MES(pH 4.5-5.0)中达到1.0 mg/mL NP浓度(0.1%固体)。将10.0 mL纳米颗粒混悬液(10 mg NP, 5.28 μ eq羧基)转移至瓶,并在连续混合下与10 μ L(5.28 μ mol, 1.0当量/ CO_2H 当量)的新制备的10 mg/mL EDC水溶液(1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐)和17 μ L(7.93 μ mol, 1.5当量/1当量EDC)的10 mg/mL磺基-NHS水溶液(N-羟基磺基琥珀酰亚胺, Sigma, 目录号56485)在室温反应15 min。将反应的混悬液在6,500 g离心并抛弃溶液。将沉淀物用20 mL 20 mM PBS/5 mM EDTA(pH 7.5)洗涤并通过在6,500 g离心进行沉淀。除去上清液。将琥珀酰亚胺活化的羧基-NP沉淀物再悬浮于50 mM PBS(pH 7.5)中,并立即加入9.8 μ L(52.8 nmol, 0.01当量/1 CO_2H 当量)的1.0 mg/mL吡啶二硫乙基胺水溶液,并允许在连续搅拌下在室温反应2-4h。将吡啶基-衍生化的羧基-NP用10 mL 20 mM PBS/5 mM EDTA(pH 7.5)洗涤,并再悬浮于10.0 mL相同缓冲液中。使用紫外-可见光光谱法(600 nm, 散射)使用羧基-NP校正曲线确定纳米颗粒浓度。如下确定NP上的吡啶基-配体负载:用10 mM TCEP或DTT还原确定量的NP,通过离心除去还原剂,将吡啶基活化的NP沉淀物重新悬浮于PBS/EDTA(pH 7.2)中,并与Ellman试剂反应(测量上清液的A412)。如果不在当天用于抗体缀合,将活化的NP在4 $^\circ\text{C}$ 储存。

[0421] 评价EDC/NHS和吡啶二硫代乙基胺摩尔输入的范围以确定用于制备不同抗体-纳米颗粒缀合物的期望化学计量学。评估反应参数(pH、温度、时间)以实现期望的NP活化结果。



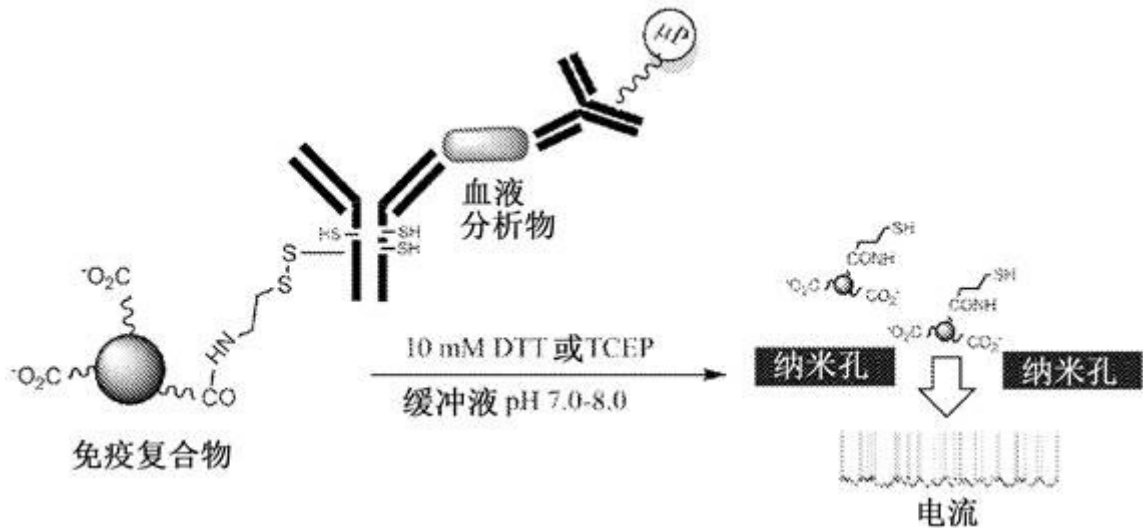
[0422] 抗体还原:将1.0 mL 10 mg/mL抗体溶液(10 mg)与38 μ L新制备的30 mg/mL 2-MEA溶液(10 mM反应浓度)(2-巯基乙胺盐酸盐)混合均匀,然后盖帽并在37 $^{\circ}$ C放置90 min。使溶液达到室温,并将多余的2-MEA用脱盐柱除去,在20 mM PBS/5 mM EDTA(pH 7.5)中预平衡。使用在A280(蛋白吸光度)和A320(散射校正)的紫外-可见光吸光度,确定还原的抗体的浓度。使用Ellman测试确定游离巯基的数目。根据需要优化条件以产生2或4个游离巯基(在抗体较链区中的Cys)。将还原的抗体立即用于偶联至吡啶基-衍生化的羧基-NP。



[0423] 还原的抗体与活化的纳米颗粒的偶联:做出假设:(1)抗体停靠面积是45 nm²; (2)26 nm纳米颗粒表面积是2,120 nm²; (3)在理论上在26 nm NP的表面上安装47个抗体分子。

[0424] 程序:向10 mL(10 mg)0.1%的吡啶基活化的羧基-纳米颗粒在20 mM PBS/5 mM EDTA(pH 7.5)中的溶液中,加入0.10 mg(0.66 nmol, 0.10 mL)还原的抗体(在相同的含有EDTA的缓冲液中在1.0 mg/mL)。使混合物在混合下在室温反应2h,离心以除去未结合的分子,并抽吸。将沉淀物用10 mL PBS(pH 7.2)洗涤,离心,并抽吸。将抗体-NP缀合物悬浮于10.0 mL PBS(pH 7.2)中。使用紫外-可见光光谱法(600 nm)确定缀合物NP浓度(%固体)。通过SEM检查颗粒缀合物,并使用ZetaSizer确定大小/电荷分布。可以使用尺寸排阻色谱法从缀合物群体的潜在分布分离不同缀合物。使用荧光地标记的抗原缀合物或使用Micro BCA(uBCA)测定,可以通过流式细胞计量术确定抗体-对-NP掺入比。可以与缀合温度和pH一起评价抗体-对-NP摩尔输入的范围,以产生不同缀合物的均匀群体(即,2或4的NP掺入比)。

[0425] 纳米孔计数免疫测定

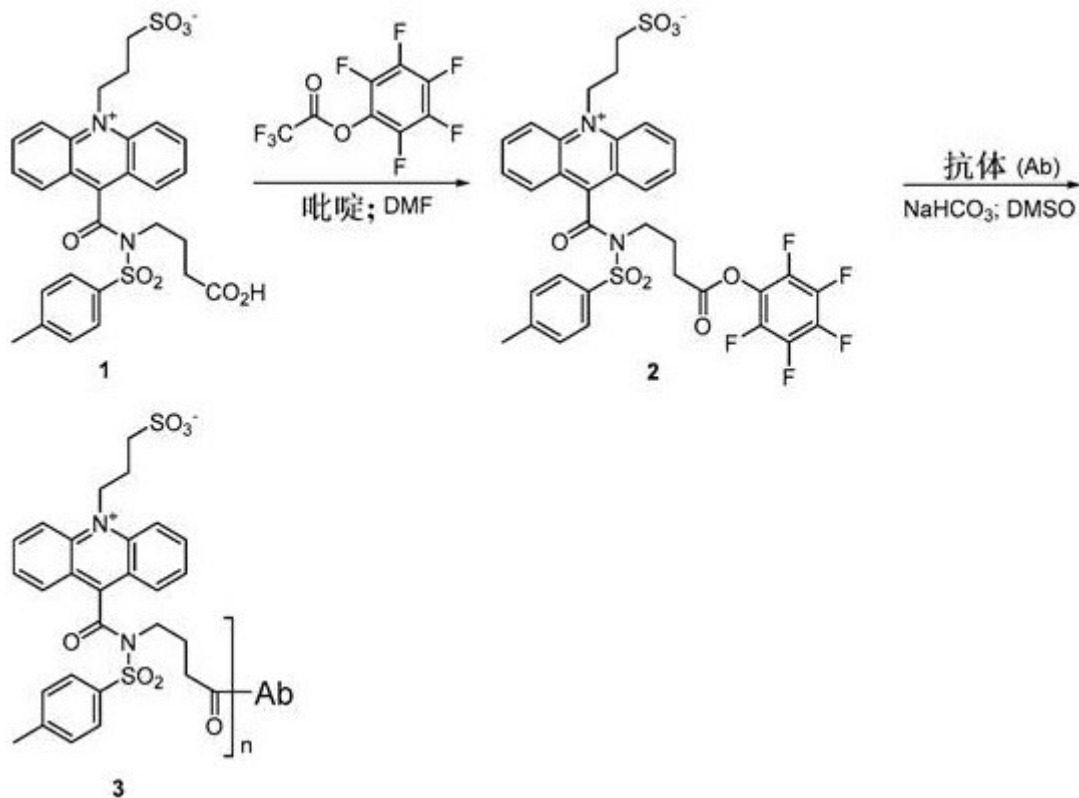


以上方案解释了利用还原的抗体活化的纳米颗粒缀合物(其制备描述在上面)的纳米孔计数测定。通过还原二硫键接头可以切割在免疫测定过程中形成的免疫复合物,以形成游离的抗体-分析物-抗体复合物和游离的纳米颗粒标签,这允许在穿过纳米孔以后计数纳米颗粒标签。

[0426] 实施例6

CPSF缀合物的合成

A. CPSF抗体缀合物.



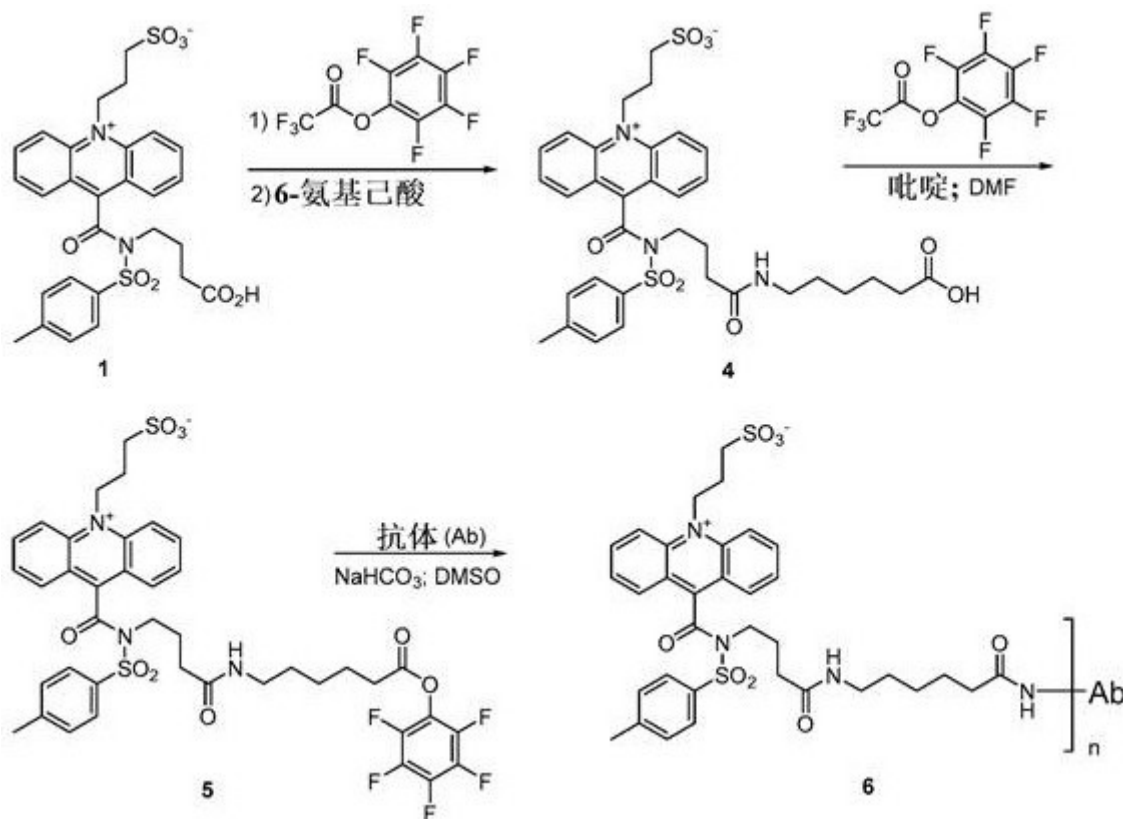
*在以上合成中,DMF是二甲基甲酰胺。

[0427] 3-(9-((4-氧代-4-(全氟苯氧基)丁基)(甲苯磺酰基)氨基甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐 (2): 给配备磁力搅拌器和氮气入口的25 mL圆底烧瓶装入3-(9-((3-羧

基丙基) (甲苯磺酰基) 氨甲酰基) 吡啶-10-鎓-10-基) 丙烷-1-磺酸盐 (CPSP) (1) (1 mmol)、吡啶 (5 mmol) 和二甲基甲酰胺 (10 mL)。将溶液在冰浴中冷却, 并逐滴加入三氟乙酸五氟苯酯 (1.3 mmol)。将冰浴除去, 并将反应物在室温搅拌3小时。将挥发性组分在真空中从反应物除去, 并将残余物溶解在甲醇中, 并通过反相HPLC纯化以得到标题化合物。

[0428] CPSP抗体缀合物 (3): 将2的溶液 (1 μ L的10 mM在DMSO中的溶液) 加入抗体溶液 (100 μ L的10 μ M水溶液) 和碳酸氢钠水溶液 (10 μ L的1M溶液)。将得到的混合物在室温搅拌4小时。产物的纯化在旋转柱上实现以得到CPSP抗体缀合物3。”n”的值以抗体依赖性的方式变化。通过升高或降低活性酯浓度 (即, 化合物2、5、9和13) 和/或通过升高或降低反应过程中的pH, 可以在某种程度上控制掺入, 但是总是导致掺入值的分布。反应以后通过实验确定平均掺入比率 (“I.R.”)。通常, “n”是1-10之间的任意值。

[0429] B. 具有间隔物的CPSP抗体缀合物。



*在以上合成中, DMF是二甲基甲酰胺。

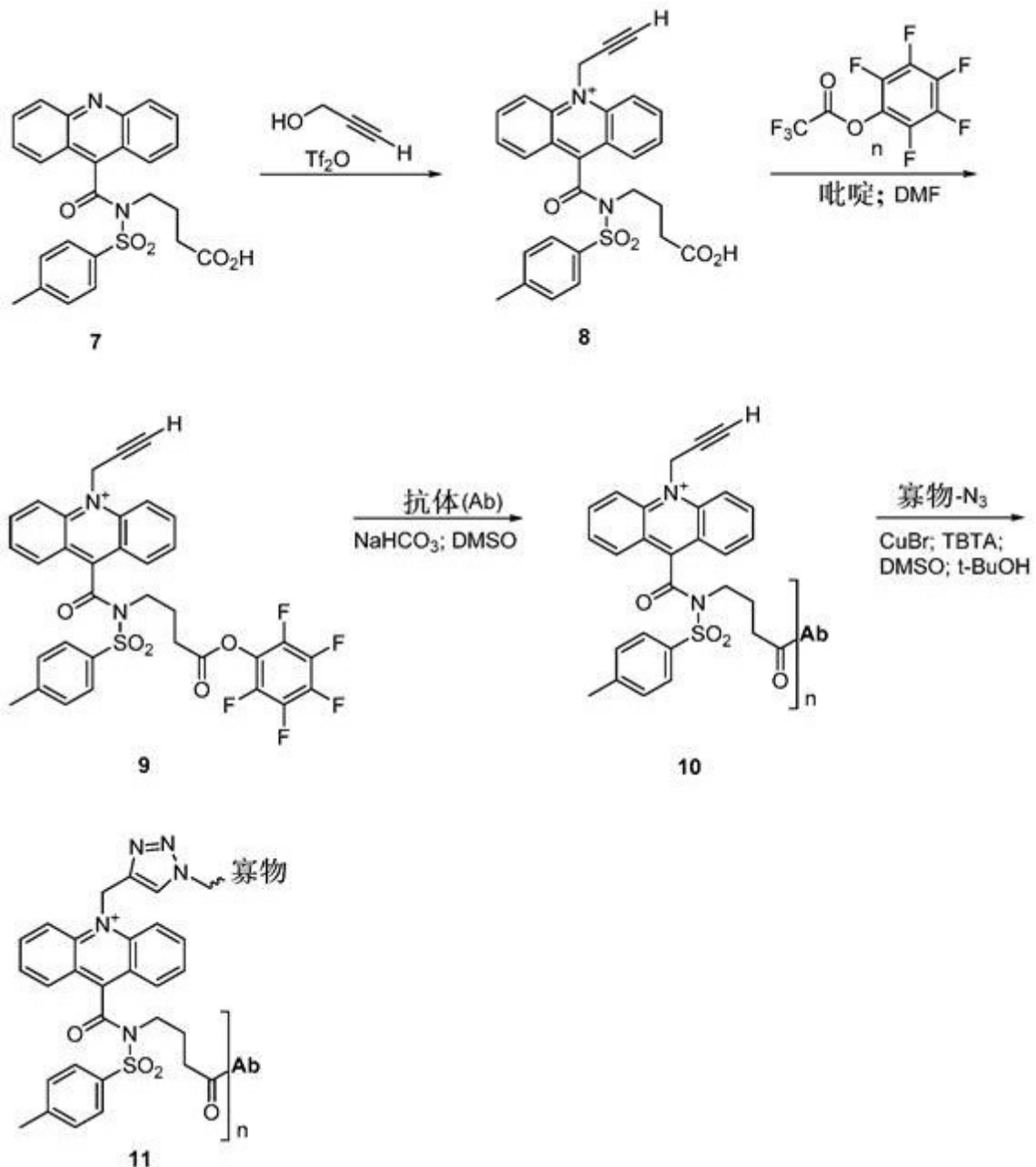
[0430] 3-(9-((4-((5-羧基戊基) 氨基)-4-氧代丁基) (甲苯磺酰基) 氨甲酰基) 吡啶-10-鎓-10-基) 丙烷-1-磺酸盐 (4): 给配备磁力搅拌器和氮气入口的25 mL圆底烧瓶装入3-(9-((3-羧基丙基) (甲苯磺酰基) 氨甲酰基) 吡啶-10-鎓-10-基) 丙烷-1-磺酸盐CPSP (1) (1 mmol)、吡啶 (5 mmol) 和二甲基甲酰胺 (10 mL)。将溶液在冰浴中冷却, 并逐滴加入三氟乙酸五氟苯酯 (1.3 mmol)。将冰浴除去, 并将反应物在室温搅拌3小时。然后将6-氨基己酸 (1.3 mmol) 以小份加入反应物, 随后加入N,N-二异丙基乙胺 (5 mmol), 并将反应物在室温搅拌1小时。该时间以后, 将挥发性组分在真空中从反应物除去, 并将残余物通过反相HPLC纯化以得到标题化合物。

[0431] 3-(9-((4-氧代-4-((6-氧代-6-(全氟苯氧基) 己基) 氨基) 丁基) (甲苯磺酰基) 氨

甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐(5): 给配备磁力搅拌器和氮气入口的25 mL圆底烧瓶装入4(1 mmol)、吡啶(5 mmol)和二甲基甲酰胺(10 mL)。将溶液在冰浴中冷却,并逐滴加入三氟乙酸五氟苯酯(1.3 mmol)。将冰浴除去,并将反应物在室温搅拌3小时。该时间以后,在氮气流下将挥发性组分从反应物除去,并将残余物通过反相HPLC纯化以得到标题化合物。

[0432] 具有间隔物的CPSP抗体缀合物(6): 将5的溶液(1 μ L的10 mM在DMSO中的溶液)加入抗体溶液(100 μ L的10 μ M水溶液)和碳酸氢钠水溶液(10 μ L的1M溶液)。将得到的混合物在室温搅拌4小时。产物的纯化在旋转柱上实现以得到具有间隔物的CPSP抗体缀合物6。通常,“n”是1-10之间的任意值。

[0433] C. CPSP寡核苷酸-抗体缀合物。



*在以上合成中,DMF是二甲基甲酰胺。

[0434] 9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)-10-(丙-2-炔-1-基)吡啶-10-鎓(8):

给配备磁力搅拌器和氮气入口的100 mL圆底烧瓶装入丙炔醇(10 mmol)、2,6-二叔丁基吡啶(10 mmol)和二氯甲烷(50 mL)并冷却至-20°C。然后将三氟甲基磺酸酐逐滴加入溶液中,并将反应物在-20°C搅拌2小时。将戊烷(25 mL)加入反应物中,并将得到的沉淀的盐通过过滤进行分离。将挥发性组分在真空中蒸发,并将残余物在100 mL圆底烧瓶中再溶解在二氯甲烷(25 mL)中。以小份加入4-(N-甲苯磺酰基吡啶-9-甲酰氨基)丁酸(CP-吡啶)(7)(1 mmol),并将反应物在室温搅拌18小时。将挥发性组分在真空中蒸发,并将残余物溶解在甲醇(5 mL)中,并通过反相HPLC纯化以得到标题化合物。

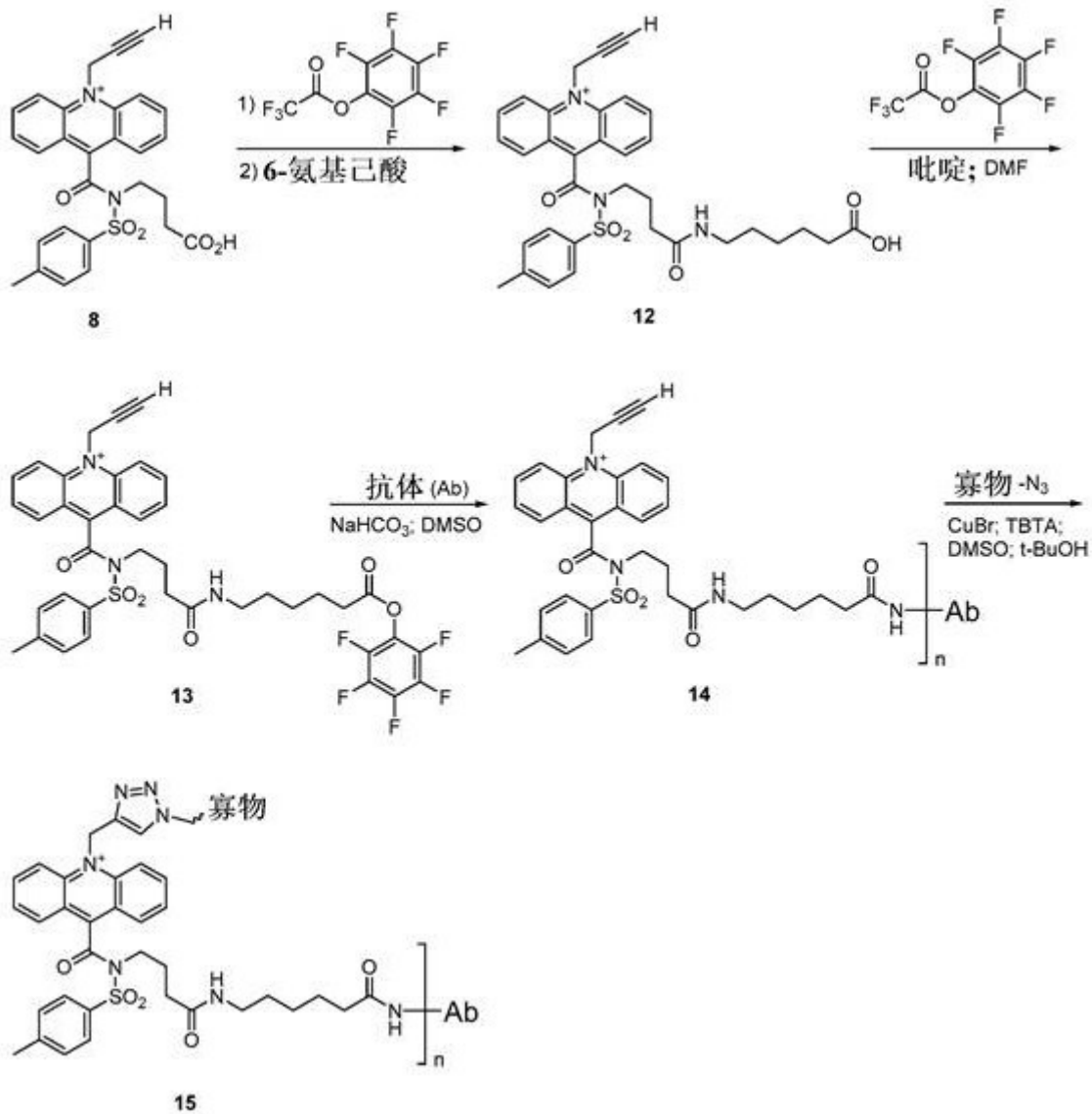
[0435] 9-((4-氧代-4-(全氟苯氧基)丁基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)-10-(丙-2-炔-1-基)吡啶-10-鎓(9):给配备磁力搅拌器和氮气入口的25 mL圆底烧瓶装入8(1 mmol)、吡啶(5 mmol)和二甲基甲酰胺(10 mL)。将溶液在冰浴中冷却,并逐滴加入三氟乙酸五氟苯酯(1.3 mmol)。将冰浴除去,并将反应物在室温搅拌3小时。将挥发性组分在真空中从反应物除去,并将残余物溶解在甲醇中,并通过反相HPLC纯化以得到标题化合物。

[0436] CPSP抗体缀合物(10):将9的溶液(1 μ L的10 mM在DMSO中的溶液)加入抗体溶液(100 μ L的10 μ M水溶液)和碳酸氢钠水溶液(10 μ L的1M溶液)中。将得到的混合物在室温搅拌4小时。产物的纯化在旋转柱上实现以得到CPSP抗体缀合物10。通常,“n”是1-10之间的任意值。

[0437] CPSP寡核苷酸-抗体缀合物(11):将寡叠氮化物(10 nmol在5 μ L水中)、CPSP抗体缀合物10(10 nmol在10 μ L水中)和新制备的0.1 M“点击溶液”(3 μ L—参见下面)的混合物在室温摇动4小时。将反应物用0.3M醋酸钠(100 μ L)稀释,并通过加入EtOH(1 mL)来沉淀DNA缀合物。将上清液除去,并将残余物用冷EtOH(2x 1 mL)洗涤2次。将残余物溶解在水(20 μ L)中,并将CPSP寡核苷酸-抗体缀合物11的溶液不经进一步纯化地使用。通常,“n”是1-10之间的任意值。

[0438] “点击溶液”:将CuBr(1 mg)溶解在70 μ L DMSO/t-BuOH 3:1中以形成0.1 M溶液(该溶液必须是新制备的且不可储存)。将三(苄基三唑基甲基)胺(TBTA)(54 mg)溶解在1 mL DMSO/t-BuOH 3:1中以形成0.1 M溶液(该溶液可以在-20°C储存)。将1体积的0.1 M CuBr溶液加入2体积的0.1 M TBTA溶液中以得到“点击溶液”。

[0439] D. 具有间隔物的CPSP寡核苷酸-抗体缀合物。



*在以上合成中,DMF是二甲基甲酰胺。

[0440] 9-((4-((5-羧基戊基)氨基)-4-氧代丁基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)-10-(丙-2-炔-1-基)吡啶-10-鎓(12): 给配备磁力搅拌器和氮气入口的25 mL圆底烧瓶装入8(1 mmol)、吡啶(5 mmol)和二甲基甲酰胺(10 mL)。将溶液在冰浴中冷却,并逐滴加入三氟乙酸五氟苯酯(1.3 mmol)。将冰浴除去,并将反应物在室温搅拌3小时。然后将6-氨基己酸(1.3 mmol)以小份加入反应物,随后加入N,N-二异丙基乙胺(5 mmol),并将反应物在室温搅拌1小时。该时间以后,将挥发性组分在真空中从反应物除去,并将残余物通过反相HPLC纯化以得到标题化合物。

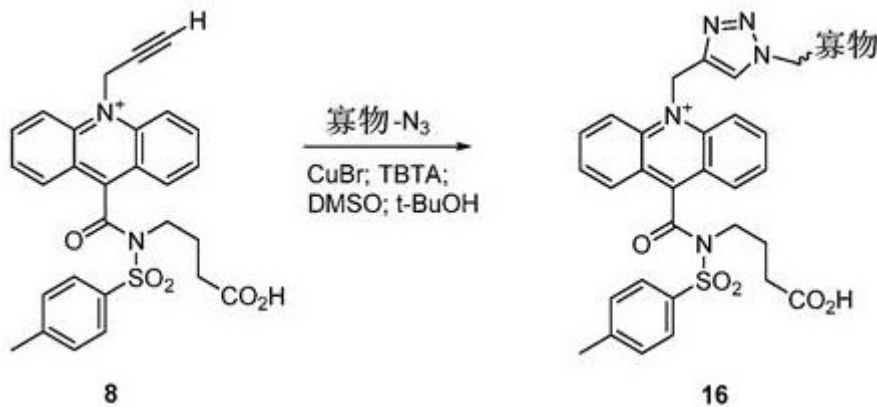
[0441] 9-((4-氧代-4-((6-氧代-6-(全氟苯氧基)己基)氨基)丁基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)-10-(丙-2-炔-1-基)吡啶-10-鎓(13): 给配备磁力搅拌器和氮气入口的25 mL圆底烧瓶装入12(1 mmol)、吡啶(5 mmol)和二甲基甲酰胺(10 mL)。将溶液在冰浴中冷却,并逐滴加入三氟乙酸五氟苯酯(1.3 mmol)。将冰浴除去,并将反应物在室温搅拌3小时。该时间以后,在氮气流下将挥发性组分从反应物除去,并将残余物通过反相HPLC纯化以得到标题化合物。

[0442] 具有间隔物的CPSP抗体缀合物(14):将13的溶液(1 μ L的10 mM在DMSO中的溶液)加入抗体溶液(100 μ L的10 μ M水溶液)和碳酸氢钠水溶液(10 μ L的1M溶液)中。将其在室温搅拌4小时。产物的纯化在旋转柱上实现以得到具有间隔物的CPSP抗体缀合物14。通常,“n”是1-10之间的任意值。

[0443] CPSP寡核苷酸-抗体缀合物(15):将寡叠氮化物(例如,诸如商购得到)(10 nmol在5 μ L水中)、具有间隔物的CPSP抗体缀合物14(10 nmol在10 μ L水中)和新制备的0.1 M“点击溶液”(3 μ L—参见实施例6.C)的混合物在室温摇动4小时。通常,“n”是1-10之间的任意值。将反应物用0.3M醋酸钠(100 μ L)稀释,并通过加入EtOH(1 mL)来沉淀DNA缀合物。将上清液除去,并将残余物用冷EtOH(2 x 1 mL)洗涤2次。将残余物溶解在水(20 μ L)中,并将具有间隔物的CPSP寡核苷酸-抗体缀合物15的溶液不经进一步纯化地使用。

[0444] 具有或没有间隔物的CPSP抗体缀合物和具有或没有间隔物的CPSP寡核苷酸-抗体缀合物的切割。使用碱性过氧化氢溶液切割或“触发”描述的具有或没有间隔物的CPSP抗体缀合物和具有或没有间隔物的CPSP寡核苷酸-抗体缀合物。在ARCHITECT[®]系统中,激发态吡啶酮中间体产生光子,测量所述光子。另外,切割产物是吡啶酮和磺酰胺。通过计数吡啶酮和/或磺酰胺分子,将实施例6.A-D的缀合物与公开的装置一起使用。

[0445] E. 没有抗体的CPSP寡核苷酸缀合物。



没有抗体的CPSP寡核苷酸缀合物(16):可以将寡叠氮化物(例如,诸如商购得到)(10 nmol在5 μ L水中)、炔丙基-CPSP 8(10 nmol在10 μ L水中)和新制备的0.1 M“点击溶液”(3 μ L—参见实施例6.C)的混合物在室温摇动4小时。可以将反应物用0.3M醋酸钠(100 μ L)稀释,并通过加入EtOH(1 mL)来沉淀DNA缀合物。可以将上清液除去,并将残余物用冷EtOH(2 x 1 mL)洗涤2次。可以将残余物溶解在水(20 μ L)中,并可以将具有间隔物的CPSP寡核苷酸-抗体缀合物16的溶液不经进一步纯化地使用。

[0446] 实施例7

低成本DMF底芯片的制造。

使用在Lo C-Y等人, Microelectronic Engineering 86 (2009) 979-983中描述的方法,经过一些修改,使用与用于电极图案形成(electrode patterning)的湿剥离过程(wet lift-off process)组合的卷对卷(roll-to-roll, R2R)柔性版印刷制造低成本柔性DMF芯片。在图10中描绘了制造过程的示意图。将一辊的MELINEX[®] ST506聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET) 5.0 mil基底(1)用作DMF电极印刷的起始原料。在Anilox辊子组件上使用3.8 ml/m²的油墨转移体积使用1.14 mm厚的印刷版(Flint MC03)以10 m/分钟的速率将一层黄

色油墨(Sun Chemical)柔性印刷(2)在PET基底上。DMF电极图案的负像源自柔性印刷步骤(3)。在金属沉积之前,将油墨在热空气烤箱中干燥2次(2 X 100°C)。使用EVA R2R金属蒸发器将银金属层沉积在印刷的PET基底上以形成80 nm厚度的均匀银涂层(4)。使用丙酮+超声的组合在声处理浴中在1 m/分钟的速度对金属化的油墨-薄膜基底(5)进行湿剥离过程(6)。该化学/物理处理允许银-油墨层溶解,同时操持仅银层完整。油墨-银层的除去产生DMF印刷的电极图案,其由80个驱动电极(2.25 X 2.25 mm)组成,具有50或140 μm电极间隙间距(7)。作为QC检查,针对电极间隙间距和连接件导线(lead)宽度变动目检来自单个辊的共80-90个随机芯片。芯片的典型产率(经确定具有可接受的间隙规范)接近100%。在图11中描绘了单个制造的柔性芯片。制造的柔性芯片测量3" X 2",且包括电极、蓄池、接触垫和导线。

[0447] 通过使用旋转丝网印刷或凹版印刷,将电介质涂层施加于电极和蓄池。对于旋转丝网印刷,通过在2 m/分钟的印刷速度和50%的紫外固化率用Gallus NF(400L)丝网印刷,使用Henkel EDAC PF-455B作为电介质涂层。典型电介质厚度是10-15 μm。对于凹版印刷,将圆筒设计成以2 m/分钟的速度使用50 ml/m²的油墨体积印刷高粘度电介质油墨,诸如IPD-350(Inkron)。用于凹版印刷的典型电介质厚度是7-8 μm。用Gravure圆筒(140-180 L)和8 m/分钟的印刷速度使用Millidyne Avalon 87或Cytonix Fluoropel PFC 804 UC涂料印刷最终的疏水层,随后是4个连续烘箱干燥步骤(4 X 140°C)。典型疏水层厚度是40-100 nm。

[0448] 可替换地,对于小批量的各个芯片,可以分别使用化学气相沉积(CVD)和自旋涂布施加电介质和疏水涂料。

[0449] 实施例8

低成本DMF芯片的功能测试

针对驱动能力测试了如在上面实施例7中所述制造的3" X 2"基于PET的DMF底芯片。图12描绘了3" X 2"基于PET的DMF芯片(1),在其上面定位0.7 mm厚的玻璃基底(3)。所述玻璃基底(3)包括在所述玻璃基底的较低表面上的透明氧化铟锡(ITO)电极和在所述ITO电极上面的特氟隆涂层。所述DMF芯片包括80个具有直边缘电极设计的银驱动电极和在电极之间的50 μm间隙,以及8个缓冲液蓄池(参见上面实施例7)。

[0450] 分别通过CVD和自旋涂布,给底电极涂布电介质Parylene-C层(6-7 μm厚)和特氟隆的最终涂层(50 nm厚)。将大约50 μL含有0.1%表面活性剂的PBS缓冲液(2)移入底DMF芯片上的四个邻近蓄池中。微滴大小范围为700-1,500 nL(一个或两个微滴),并针对垂直和水平横向运动进行检查(4),除了混合必需的圆形扫描模式以外。使用90 V_{rms}的电压实现微滴驱动。测试了所述芯片上大约90%的驱动电极,并发现是完全功能的。

[0451] 实施例9

在低成本DMF芯片上的TSH免疫测定

使用化学发光检测,针对它的进行促甲状腺激素(TSH)免疫测定的能力,测试了如在上面实施例8中所述的用玻璃基底覆盖的3' X 2"基于PET的DMF芯片。假样品包括掺入含有封闭剂和表面活性剂的tris缓冲盐水(TBS)缓冲液中的TSH校准材料。测试了3个样品——0、4、40 μIU/ml。将2 μL包被在5 μm磁性微粒(3 X 10⁸个颗粒/ml)上的抗-βTSH捕获抗体从微粒蓄池分配进DMF电极阵列的中央。通过在DMF芯片下接合钕磁体条(3英寸 X 1/2英寸 X 1/4

英寸厚,相对渗透性 $\mu_r = 1.05$, 残余场强度 $B_r = 1.32$ T),将磁性微粒与缓冲液分离(图13A)。将5 μ L样品移动至微粒块(slug),随后在4电极正方形构型上混合微粒混悬液(图13B)5分钟。通过磁体将微粒与样品分离,并将上清液移动至废物蓄池(图13C和13D)。将2 μ L 1 μ g/mL与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗-TSH检测抗体移动至微粒块并混合2分钟。用磁体分离微粒,并将上清液移动至废物蓄池。将含有免疫测定夹心复合物的微粒用4 X 2 μ L含有0.1%表面活性剂的PBS洗涤缓冲液洗涤共4次。将来自每个洗涤步骤的洗涤缓冲液在所述步骤结束后移动至废物蓄池。将由1 μ L SuperSignal H₂O₂和1 μ L鲁米诺(ThermoFisher Scientific)组成的化学发光底物移动至微粒块,随后混合6分钟。使用集成的Hamamatsu H10682-110 PMT用5 V DC源在427 nm发射(347 nm激发)测量化学发光信号。相对于相对发光绘制剂量-响应曲线(参见图13E)。

[0452] 实施例10

纳米孔模块制造

使用与商购可得的氮化硅(SiN_x)膜(其嵌入在TEM窗口(Norcada)中)的集成偶联的标准软光刻制造方法,制造纳米孔模块。所述模块由四个单独的PDMS层组成——含有转移微通道的顶和底PDMS基底,和两个任选的中间PDMS层以密封TEM窗口。

[0453] SU8主模制造:给干净的干燥玻璃基底自旋涂布光致抗蚀剂(SU8-50)至所需的厚度。然后使用光掩模版将涂布的基底的区域选择性地暴露于近紫外光。所述掩模版仅在要保留转移微通道和蓄池形状的区域中将光致抗蚀剂暴露于紫外光。暴露之后进行烘烤以交联暴露的光致抗蚀剂区域。然后使用SU8显影剂从基底除去剩余的、未暴露的光致抗蚀剂。终产物是主模——具有图案化的转移微通道和硬光致抗蚀剂蓄池的玻璃基底。

[0454] 中间PDMS层制造:为了制造中间PDMS层,将含有PDMS单体和它的固化剂(Sylgard 184有机硅弹性体)(在7:1 PDMS单体:固化剂的比率)的溶液自旋涂布在载玻片上,随后在热板上在70°C加热30分钟。将PDMS层从玻璃基底剥离,并穿过PDMS层冲出1.25 mm切出部分以提供允许接近TEM窗口的开口。通过使用电晕处理器在8 mm的距离等离子体处理30秒,使PDMS层的表面是亲水的。使用第二次等离子体处理(5秒)来处理PDMS层的表面和TEM窗口,然后将SiN_x TEM窗口粘在两个中间PDMS层之间。

[0455] 顶和底PDMS制造:如图14B所示,如下制造含有微通道的顶和底PDMS基底:以7:1 PDMS单体:固化剂的比例混合PDMS单体和固化剂,并倒在玻璃上面,所述玻璃含有用转移微通道和蓄池图案化的SU8图案化模具(6)(参见上述的SU8主模制造)。微通道测量大约110-135 μ m宽度和50 μ m深度。脱气15分钟以后,将SU8模具在热板上在70°C加热60分钟(7)。固化以后,将PDMS基底剥离SU8模具(8)并切割以产生具有30 mm长度X 20 mm宽度X 3 mm深度的近似大小的矩形PDMS基底。穿过PDMS基底冲出访问孔(1.25 mm直径)以允许随后将电极插入微通道中。最后的组件显示在图14A中,且从底至顶包括:含有一个微通道(1)的底PDMS基底,含有定位在所述微通道上面的切出部分的第一个中间PDMS层(2),在TEM窗口(3)中的SiN_x膜,也含有切出部分的第二个中间PDMS层(4),和含有第二微通道的顶PDMS基底(5)。

[0456] 顶和底PDMS基底的对齐:将PDMS底基底(如在上面“顶和底PDMS制造”中所述制备)用等离子体处理30秒,随后将第一个中间PDMS层(如在上面“中间PDMS层制造”中所述制备)粘在PDMS底基底上。类似地,将PDMS顶基底用等离子体处理30秒,随后将第二个中间PDMS层粘在PDMS顶基底上。使中间层中的切出部分与微通道对齐。将顶和底PDMS片用氧等离子体

处理30秒,随后将SiN_x膜窗口布置在顶和底片之间并与中间PDMS层中的切出部分对齐。将与SiN_x膜(其与底片对齐)对齐的顶片压在一起直到所有气泡被释放。将最后的纳米孔PDMS组件在热板上在100℃加热30分钟并用等离子体处理5分钟。在图14C(9a)中显示的最后模块组件含有两个通道(一个直通道和一个“L-形”通道),每个终止于溶液(例如,缓冲液)的蓄池。含有SiN_x膜的TEM窗口定位在两个垂直微通道的相交处(图14C, 9b)。

[0457] 实施例11

纳米孔制造

如下完成纳米孔制造:对容纳在两个PDMS层之间的SiN_x TEM窗口进行电势偏置直到发生介质击穿,由此在膜中打开一个小直径孔。这允许在检测分析物之前在微流体装置内原位形成孔。以前已经证实通过介质击穿实现的纳米孔形成可用于固态电介质膜中的小直径孔的快速制造(H. Kwok, K. Briggs, V. Tabard-Cossa, *PLoS-One*, 9(3), 2014)。

[0458] 将作为透射电子显微镜(TEM)窗口(Norcada)商购可得SiN_x膜嵌入组装的PDMS模块(如上面实施例10中所述)中,并用于制备纳米孔。垂直微通道会合处将SiN_x TEM窗口的横断面区域(50 μm X 50 μm)暴露于设置在膜的相对侧(顺和反)上的盐溶液(1 M KCl)。将Ag/AgCl电极放入每个微通道中,从SiN_x TEM窗口的中央进入穿过PDMS基底冲出的孔大约3 mm。使用含有钝针的注射器通过将乙醇加入两个蓄池来填充顺和反微通道,直到观察到液体从模块边缘上的通道开口出现。测量电阻以检查适当密封并确保TEM-SiN_x膜是完整的。在MΩ量级的电阻指示良好密封以及完整且未损伤的膜。将乙醇用去离子水冲出微通道,并通过注射进两个蓄池用1 M KCl溶液替换。再次测量电阻以检查适当密封。

[0459] 将4.4 V的恒定电压施加于膜组件,并实时监测泄漏电流。在图15A中绘制了实时测量的泄漏电流。图15A显示了在纳米孔建立之前的泄漏电流(1)。使用>5 nA的阈值作为截止值,即预示孔建立。大约10分钟以后,观察到泄漏电流的增加(2)。在检测到泄漏电流的增加以后,立即关闭电压。建立的孔的直径是6.9 nm,如以下关系式所确定的:

$$G = \sigma \left(\frac{4L}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right)^{-1}$$

其中G = 电导,σ = 体积电导率(为KCl测得12.35 S/m),L = 膜的厚度(10 nm),d = 孔直径(S. Kowalczyk, A. Grosberg, Y. Rabin, C. Dekker, *Nanotech.*, 22, 2011)。

[0460] 孔建立以后,使用电流-电压(I-V)曲线(参见图15B)验证,所述纳米孔显示欧姆性能,从而指示所述纳米孔在形状上是对称的,且电阻独立于施加的电压或电流。将相同的1 M KCl溶液用于孔制造和I-V曲线。

[0461] 实施例12

干燥微通道填充

针对它的自发填充来自DMF电极组件的高盐溶液的能力,测试了在组装的PDMS模块(即,包括DMF模块和纳米孔模块的集成装置)中所含的毛细管导管(图16A-16C)。通过自发的毛细管流(SCF)完成填充。为了允许更好地观察微通道,没有包括纳米孔膜。参考图16A,使用含有80个驱动电极(1)(2.25 mm X 2.25 mm, Cr- 200 nm厚度)的玻璃DMF芯片(3”X 2”X 0.0276”)移动3.6 M LiCl、0.05%Brij 35和蓝色染料(以辅助观察)的微滴(2)。PDMS模块(3)含有两个面向DMF电极阵列的开口(4)、两个蓄池(5)和两个微通道——一个直通道

(6) 和一个L-形通道(7)。将所述模块组件放在DMF玻璃表面上,使得两个通道开口面向DMF电极阵列的内部。由于没有使用顶接地电极芯片,通过使用共平面底电极产生驱动电势来实现微滴运动。

[0462] 将蓝色LiCl盐溶液的10 μL 微滴放在DMF电极阵列中央的电极上。使用100 V_{rms} (10 kHz)的电压将微滴移动至在直微通道开口附近的转移电极。如在图16B中所示,所述微滴接触PDMS表面(8)以后,测量填充130 μm 直径直通道(9)并到达蓄池所需的时间。如在图16C中所示,大约30秒以后,微滴的体积看起来更小(10)且所述通道被半填充(11)。填充整个干燥微通道(130 μm 直径)需要53秒的总时间。

[0463] 湿微通道填充:将蓝色LiCl盐溶液的10 μL 微滴放在DMF电极阵列中央的电极上。使用100 V_{rms} (10 kHz)的电压将微滴移动至在直微通道开口附近的转移电极。所述通道用乙醇预填充以模仿预润湿的通道。所述微滴接触PDMS表面以后,将所述通道填充至蓄池需要<1秒的时间。这显著地快于干燥通道,从而提示用亲水溶液预润湿会提高微通道填充速率。

[0464] 实施例13

集成的硅NP装置中的DMF微滴转移

除了柔性基底诸如PDMS以外,刚性基底(例如硅)可以用于制造纳米孔模块。图17显示了含有驱动电极(4)的数字微流体(DMF)芯片(1),微滴从所述驱动电极(4)转移至含有纳米孔传感器(2)的硅微流体芯片。微滴通过访问端口(3)在两个组分芯片之间转移,所述访问端口(3)是在含有纳米孔传感器的微流体芯片的顶表面。访问端口通过微流体通道(6)连接至纳米孔传感器(5)。微滴从访问端口移动,通过毛细管力穿过微流体通道,且从微柱阵列(7)制造的被动纸泵可以辅助运动(图18)。所述被动泵也可以从微通道除去流体,从而使不同的流体溶液在没有污染的情况下依次使用(例如,在用于纳米孔形成和纳米孔感知的溶液之间)。

[0465] 硅纳米孔模块的制造可以包括使用标准的CMOS光刻和蚀刻方法。图18显示了硅纳米孔模块设计的一个实施例,其中近似模具大小是10 mm X 10 mm,具有用于填充纳米孔缓冲液的前侧通道(顺)和后侧通道(反)。前侧通道具有30 μm 的宽度和深度,且是11 mm长。后侧通道具有50 μm 的宽度、200 μm 的深度,且是11 mm长。微柱尺寸是30 μm 柱直径、30 μm 的间距和200 μm 的深度。

[0466] 使用从模塑塑料制造的接口或通过直接粘合,可以连接DMF和纳米孔模块(图19和20)。定位在与访问端口对齐的DMF芯片内的电极(4)上的微滴通过毛细管力转移,由插入器(interposer)(7)加速。可替换地,通过引入将驱动电极(4)与插入器(8)连接的孔,可以修改DMF芯片的顶电极(8)以进一步促进该过程(图20)。

[0467] 实施例14

通过毛细管力在DMF和纳米孔模块之间的微滴转移

在硅微流体芯片中测试了将高盐转移缓冲液从DMF芯片移动至含有合适纳米孔膜的模块的能力。使用自发毛细管流(SCF)作为唯一驱动力,针对它的被动地移动1 M KCl (pH=8)的微滴的能力测试了弯曲微通道。整个微通道在硅中制造并充当在基于CMOS的硅环境中的流体转移的模型。将弯曲微通道设计成具有两个访问端口(用于流体加载)。通道大小测得160 μm 直径,具有2.5 cm的近似长度。适合用于通过介质击穿形成纳米孔的溶液的微滴被

证实使用被动毛细管力填充硅微流体结构。

[0468] 参考图21,将1M KCl溶液(pH=8.0)的各个微滴放在连接至运输微流体通道(2)的入口端口(1)之一中,从而导致2.5 cm长度的弯曲通道(3)。所述通道终止(4)于暴露于大气压的端口(未显示)。在图22中显示了弯曲通道的放大图像。使用与光学显微镜配合的sCMOS照相机监测毛细管填充。盐溶液在入口端口中的沉积导致通过被动毛细管力在几mm/秒的速率对微通道的自发填充,由此证实在微通道中向纳米孔膜转移流体的能力。

[0469] 作为转移速率的另一个测试,将通道排空KCl溶液并在氮气流下干燥。将1M KCl溶液(pH=8.0)的另外微滴放在经干燥的微通道的入口端口中,并使用光学显微镜监测毛细管填充。相对于“干燥”通道(即,相对于将KCl溶液引入所述通道中的第一次),观察到更快的填充速率,由此表明亲水溶液对硅微通道的预填充会增强随后的流体填充。

[0470] 实施例15

具有流体微通道的集成纳米孔传感器的制造

使用光刻和蚀刻方法改变绝缘体上的硅(silicon-on-oxide,SOI)晶片,制造具有流体微通道的集成纳米孔传感器(图23A-23B)。

[0471] 对SOI晶片(1)进行光刻和蚀刻(2)以产生适合小流体体积的运动的运动的结构(3),其具有30 μm 宽度和10-30 μm 通道深度的大小。

[0472] 通过蒸发(4)将氮化硅(SiN)材料(5)沉积在图案化的SOI晶片上。

[0473] 通过蒸发(6)将氧化物材料层(7)沉积在氮化硅(5)上面。通过使用光刻和蚀刻的组合选择性地除去覆盖微结构之一的叠加氧化物和氮化物材料(6)来暴露基础硅(1)。该结构将形成用于驱动小体积的流体的微通道。

[0474] 通过使用光刻和蚀刻的组合仅除去叠加氧化物层,选择性地暴露第二微结构内的基础氮化硅(8)。

[0475] 暴露的微结构永久性地粘合至载体晶片(9),并将所述结构反转用于进一步处理(10)。使用光刻和蚀刻的组合来暴露每个微结构的背侧,将SOI晶片的反侧上的氧化物材料选择性地图案化(11)。

[0476] 实施例16

可切割的DNA-生物素构建体的合成

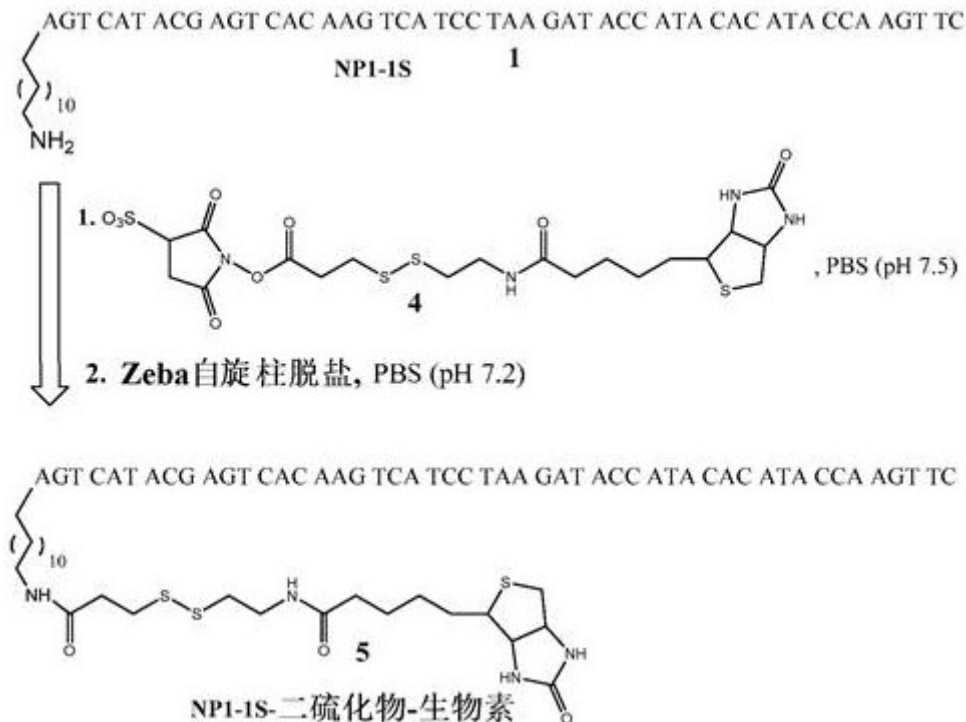
非生物素化的双链DNA(NP1)的合成:使用标准的氨基亚磷酸酯化学(Integrated DNA Technologies)合成两种单链50-聚体。寡物NP1-1S由50核苷酸DNA序列组成,所述DNA序列含有在5'-端上的氨基,其与DNA被C-12碳间隔物间隔(SEQ ID NO: 1)(1, MW=15,522.3 g/mol, $\epsilon=502,100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。寡物NP1-2AS由与NP1-1S互补的50核苷酸DNA序列组成(SEQ ID NO: 2)(2, MW=15,507.1 g/mol, $\epsilon=487,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。将两种寡核苷酸定量并冻干,然后进行后续操作。

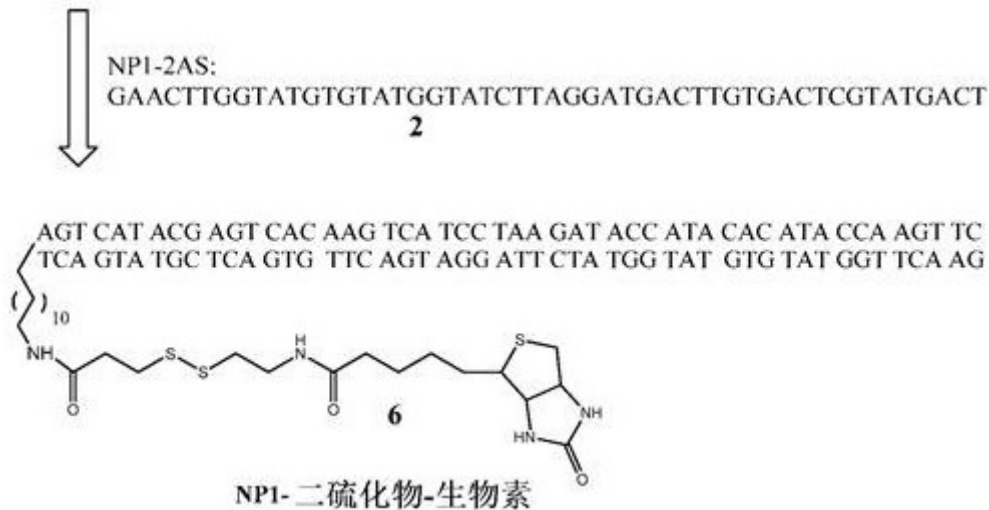
NP1-1S: **1**
H₂N-AGTCATACGAGTCACAAGTCATCCTAAGATACCATACACATACCAAGTTC

NP1-2AS: **2**
GAACTTGGTATGTGTATGGTATCTTAGGATGACTTGTGACTCGTATGACT

最终的ds-DNA设计-NP1: **3**
H₂N-AGTCATACGAGTCACAAGTCATCCTAAGATACCATACACATACCAAGTTC
TCAGTATGCTCAGTGTTCAGTAGGATTCTATGGTATGTGTATGGTTCAAG

[0477] 非生物素化的双链50-bp DNA构建体的合成:将NP1-2AS(1.44 mg, 93.4 nmol)在0.5 mL蒸馏水中重构以得到187 μ M溶液。将NP1-1S(1.32 mg, 85.3 nmol)在0.5 mL 50 mM磷酸盐、75 mM氯化钠缓冲液(pH 7.5)中重构以得到171 μ M溶液。通过使60 μ L NP1-1S溶液(10.2 μ mol)与40 μ L NP1-2AS溶液(7.47 μ mol)一起退火,制备双链构建体(3)(SEQ ID NO: 1- 正向链(顶);SEQ ID NO: 2- 反向链(底))。将所述混合物放在85 $^{\circ}$ C的加热块中30 min,随后历时2小时缓慢冷却至室温。通过将整个退火体积(100 μ L)注射在用10 mM PBS缓冲液(pH 7.2)平衡过的TosoH G3000SW柱(7.8 mm x 300 mm)上,纯化双链材料。在260和280 nm监测柱洗脱液。双链材料(3)在7.9分钟(约20分钟)洗脱。使用0.5 mL Amicon过滤器浓缩器(MW截止10,000 Da)将所述DNA浓缩至150 μ L。最后的DNA浓度计算为40.5 μ M,如通过A₂₆₀吸光度确定的。





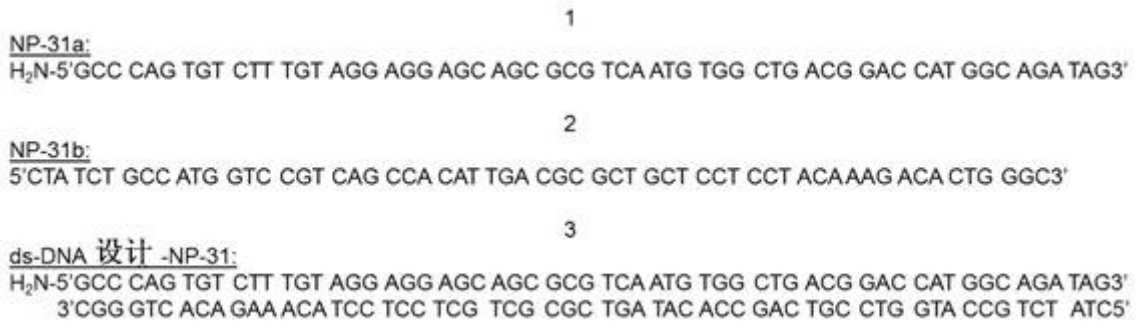
[0478] 单链5'-氨基寡物的生物素化: 通过将6 mg粉末溶解在0.099 mL无水DMSO(Sigma Aldrich)中, 制备100 mM的磺基-NHS-SS-生物素(4, ThermoFisher Scientific)溶液。将所述溶液涡旋并立即用于生物素化5'-氨基-DNA。将约100 μ L ssDNA(1, 171 μ M, 17.1 μ mol, 0.265 mg)(SEQ ID NO: 1)在50 mM PBS(pH 7.5)中的溶液与3.4 μ L 0.1 mM生物素化试剂在DMSO中的溶液(34.1 μ mol, 相对于ssDNA而言20倍摩尔过量)混合。将所述混合物混合并允许在室温反应2小时。将两个0.5 mL Zeba自旋脱盐柱(MW截止7,000 Da, ThermoFisher Scientific)在10 mM PBS(pH 7.2)中平衡。将粗制的生物素化的ssDNA溶液加入一个Zeba柱并在4,600 rpm洗脱1.3分钟。将洗脱液转移至第二个Zeba柱并如所述洗脱。通过测量A₂₆₀吸光度, 确定纯化的NPI-1S-SS-生物素(5)(SEQ ID NO:1)的浓度(2.03 mg/ml, 131 μ M)。

[0479] 生物素化的双链DNA的形成: 将大约60 μ L NPI-1S-SS-生物素溶液(5, 7.85 μ mol, 131 μ M, 2.03 mg/mL)与42 μ L NPI-2AS溶液(2, 7.85 μ mol, 187 μ mol/L)(SEQ ID NO: 2)混合。将所述溶液放在85°C的加热块中30分钟, 随后历时2小时缓慢冷却至室温。通过注射整个退火体积(约100 μ L), 使用10 mM PBS(pH 7.2)在TosoH G3000SW柱(7.8 mm x 300 mm)上面纯化双链产物。双链生物素化材料在7.9分钟(20分钟运行时间)洗脱, 如通过A₂₆₀吸光度监测的。使用0.5 mL Amicon过滤器浓缩器(MW截止10,000 Da)将洗脱液体积减小至480 μ L。最后的NPI-二硫化物-生物素(6)(SEQ ID NO:1- 正向链(顶); SEQ ID NO:2- 反向链(底))浓度计算为16.3 μ M, 如通过A₂₆₀吸光度确定的。

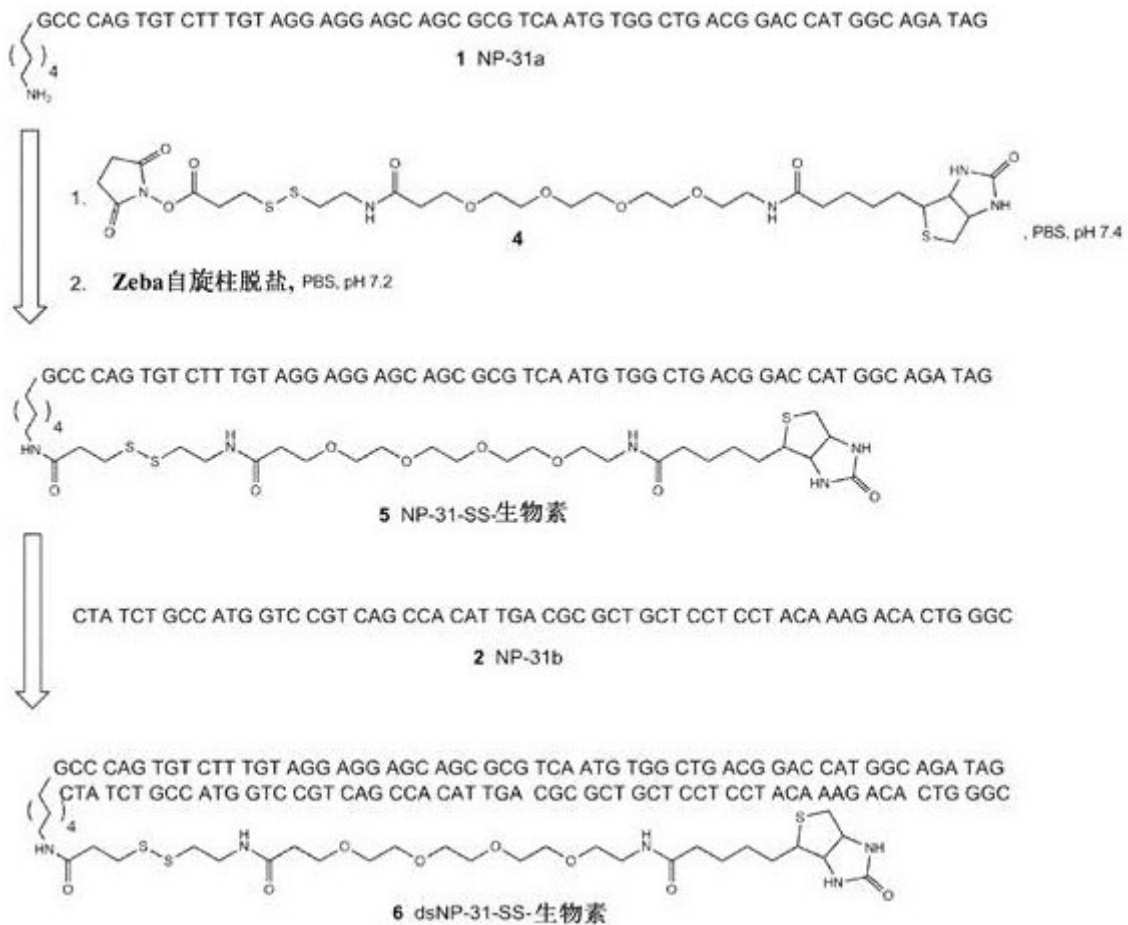
[0480] 实施例17

可切割的DNA-生物素构建体的替代合成

互补DNA序列(NP-31a和NP-31b): 使用标准的氨基亚磷酸酯化学(Integrated DNA Technologies)合成两种单链60-聚体。寡物NP-31a由60核苷酸DNA序列组成, 所述DNA序列含有在5'-端上的氨基, 其与DNA被C-6碳间隔物间隔(SEQ ID NO: 3)(1, MW=18,841.2 g/mol, 1.7 μ M/OD)。寡物NP-31b由与NP-31a互补的60核苷酸DNA序列组成(SEQ ID NO: 4)(2, MW=18292.8 g/mol, 1.8 μ M/OD)。将两种寡核苷酸定量并冻干, 然后进行后续操作。



[0481] 单链5'-氨基寡物NP-31a的生物素化: 通过将15.04 mg粉末溶解在2.0 mL二甲基甲酰胺(Sigma Aldrich)中, 制备10 mM NHS-S-S-dPEG₄-生物素(4, MW=751.94 g/mol, Quanta BioDesign, Ltd)溶液。将所述溶液涡旋并立即用于生物素化5'-氨基-DNA。将约100 μL ssDNA(1, 100 μM, 0.01 μmol, 0.188 mg)(SEQ ID NO: 3)在10 mM磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 7.4)中的溶液与10 μL 10 mM生物素化试剂在DMF中的溶液(0.1 μmol, 相对于ssDNA而言10倍摩尔过量)混合。将所述混合物混合并允许在室温反应2小时。将两个0.5 mL Zeba自旋脱盐柱(MW截止7,000 Da, ThermoFisher Scientific)在10 mM PBS(pH 7.2)中平衡。将粗制的生物素化的ssDNA溶液加入一个Zeba柱并在4,600 rpm洗脱2分钟。将洗脱液转移至第二个Zeba柱并如所述洗脱。通过测量A₂₆₀吸光度, 确定纯化的NP-31-SS-生物素(5)(SEQ ID NO: 3)的浓度(1.45 mg/mL, 77 μM)。



[0482] 生物素化的双链DNA的形成: 将大约60 μL NP-31-SS-生物素溶液(5, 77 μM)(SEQ ID NO: 3)与50 μL NP-31b溶液(2, 100 μM)混合。将所述溶液放在85℃加热块中30分钟,

随后历时2小时缓慢冷却至室温。通过注射整个退火体积(大约100 μL),使用10 mM PBS(pH 7.2)将双链产物(SEQ ID NO:3- 正向链(顶);SEQ ID NO:4- 反向链(底))在TosoH G3000SW柱(7.8 mm x 300 mm)上纯化。双链生物素化材料在7.57分钟洗脱,如通过A₂₆₀吸光度监测的。使用0.5 mL Amicon过滤器浓缩器(MW截止10,000 Da)减小洗脱液体积。最后的dsNP-31-SS-生物素(6)(SEQ ID NO: 3- 正向链(顶);SEQ ID NO: 4- 反向链(底))浓度计算为11 μM ,如通过A₂₆₀吸光度确定的。

[0483] 实施例18

可切割的DNA-生物素(巯基介导的切割构建体)的合成

ssNP-31-SS-生物素与抗生蛋白链菌素包被的磁性微粒(SA-MP)的结合和化学切割(TCEP或DTT):通过下述方法在磁性微粒上执行化学切割实验(参见图25)。将100 μL 的77 μM 经修饰的寡核苷酸ssNP-31-SS-生物素在PBS(pH 7.2)中的溶液与1 μL 0.1%抗生蛋白链菌素顺磁微粒一起在室温温育30分钟。通过将颗粒吸引至磁体和用PBST缓冲液(pH 7.4)洗涤10次,除去多余的寡物。将寡物结合的颗粒与不同浓度的DTT或TCEP在PBS(pH 7.4)中的溶液一起温育15分钟。将微粒用PBST缓冲液(pH 7.4)洗涤10次以除去任何切割的寡核苷酸。将含有荧光团的互补序列NP-31c(SEQ ID NO: 5)(7, MW=7494.6 g/mol, 5.2 $\mu\text{M}/\text{OD}$)与前述微粒一起在PBS(pH 7.4)中温育30分钟以结合在所述颗粒上保持完整的任何未切割的ssNP-31-SS-生物素。将所述微粒吸引至磁体并用PBST缓冲液(pH 7.4)洗涤10次以除去任何多余的NP-31c区段。如上制备的经过洗涤但是没有进行化学切割的经包被的微粒充当对照。通过荧光显微术测量颗粒上的荧光信号。对于DTT和TCEP在79%和93%测得最大切割效率,分别如表1中所示。

7

NP-31c:

AlexaFluor® 546-5'CTA TCT GCC ATG GTC CGT CAG3'

[0484] 表1

DTT (mM)	在微粒上的荧光信号(相对光单位)	切割效率
50	3579	79%
25	7417	57%
12.5	11642	32%
0.78125	17052	0%
0	17059	(对照)
TCEP (mM)	在微粒上的荧光信号(相对光单位)	切割效率
250	460	93%
222	448	94%
187	474	93%
142	512	92%
83	477	93%
45	453	93%
19	452	93%
0	5023	(对照)

[0485] 实施例19

可切割的DNA-生物素(光切割构建体)的合成

在微粒上评价光可切割的DNA序列和切割效率:使用标准的氨基亚磷酸酯化学(Integrated DNA Technologies)合成光可切割的单链DNA序列。所述寡核苷酸由构成2个寡物区段(寡物8-1(SEQ ID NO: 6)和寡物8-2(SEQ ID NO: 7))的48个核苷酸组成,所述寡物区段被两个光可切割的部分(8, MW = 15,430.1 g/mol, 441800 L mol⁻¹ cm⁻¹)间隔。5'-端含有被C-6碳间隔物从DNA间隔的氨基。合成含有荧光标记的与寡物8-2互补的链(9, MW = 7738.8 g/mol, 212700 L mol⁻¹ cm⁻¹)(SEQ ID NO: 8)。将两种寡核苷酸定量和冻干,然后进行后续操作。

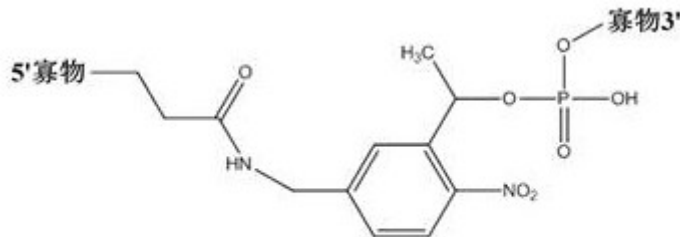
寡物 8-1 (SEQ ID NO: 6): 5'AAA AAA GGT CCG CAT CGA CTG CAT TCA3'

寡物 8-2 (SEQ ID NO: 7): 5'CCC TCG TCC CCA GCT ACG CCT3'

[0486] NP-8(8) (由两个光可切割的部分("PC")连接的寡物8-1(SEQ ID NO: 6)和寡物8-2(SEQ ID NO: 7)):

H₂N-5'AAAAAAGGTCCGCATCGACTGCATTCA-PC-PC-CCCTCGTCCCCAGCTACGCCT3'

NP-9 (9) (SEQ ID NO: 8): AlexaFluor546-5' AGG CGT AGC TGG GGA CGA GGG3'



光可切割的部分(PC)

通过下述方法在磁性微粒上执行光切割实验(参见图26A和26B)。将NP-8共价地附接到抗体以产生Ab-寡物复合物(由Biosynthesis Inc.制备)。将100 μL 33 nM抗体-寡物复合物与1 μL山羊抗-小鼠微粒的0.1%固体一起在室温温育30分钟。通过将所述颗粒吸引至磁体并用PBST缓冲液(pH 7.4)洗涤10次,除去多余的抗体-寡物复合物。将微粒复合物溶液在紫外光(300-350 nm波长)下照射5分钟。将微粒吸引至磁体并用PBST缓冲液(pH 7.4)洗涤10次以除去任何切割的寡物区段。将颗粒重新悬浮于PBST缓冲液(pH 7.4)以后,将荧光地标记的寡物9(SEQ ID NO: 8)加入照射的微粒并在室温温育30分钟。如上制备的经过洗涤但是没有进行紫外照射的经包被的微粒(未切割的寡物8-2)充当对照。通过荧光显微镜成像颗粒上的荧光信号(AlexaFluor® 546)。在74%测得与顺磁微粒结合时的切割效率,如表2所示。

[0487] 表2

	在微粒上的荧光信号(相对光单位)
照射	3660
无照射(对照)	13928

切割效率	74%
------	-----

[0488] 实施例20

热可切割的接头

本实施例描述了热可切割的接头和它们的切割。这样的热可切割的接头可以用在例如DMF芯片、基于微滴的微流体芯片、SAW芯片等中，如本文所述。

[0489] 通过将温度升高至阈值以上来切割热可切割的接头，诸如在双链DNA的热分离中。通过将能量从光转移至吸收靶标，可以光热地实现DMF芯片中的温度升高。在一种方法中，可以将具有约980 nm(范围约930 nm至约1040 nm)的波长的光源(诸如激光)施加于流体样品区域中的DMF芯片。所述光可以被流体中的水分子吸收，从而导致温度的升高和接头的切割。通过脉冲长度、脉冲能量、脉冲数目和脉冲重复率可以控制加热的水平和持续时间。例如，使用水的吸光带的光热加热描述在例如美国专利6,027,496中。

[0490] 通过将光源与含有染料或颜料的靶标偶联也可以实现光热加热。在该情况下，用吸光染料或颜料(例如炭黑)印刷DMF芯片的靶区域。当流体与靶标发生接触时，将光源(例如商购可得的激光二极管)指向吸光靶标，从而导致温度的局部升高和接头的切割。通过靶标的吸光性质、光波长、脉冲长度、脉冲能量、脉冲数目和脉冲重复率可以控制加热的水平和持续时间。例如，使用与吸光靶标组合的光源的光热加热描述在美国专利6,679,841中。

[0491] 在光热加热的第三种方法中，可以将吸光染料或颜料引入DMF芯片内的流体中。然后穿过DMF芯片传播光，并将能量转移至溶解的或悬浮的吸光材料，从而导致温度的局部升高和接头的切割。通过靶材料的吸光性质、光波长、脉冲长度、脉冲能量、脉冲数目和脉冲重复率，控制加热的水平和持续时间。在该方法的一个实施方案中，所述吸光靶标是在所述装置中使用的磁性微粒混悬液。例如，使用在流体微滴中的悬浮纳米颗粒的光热加热描述在Walsh等人, *Analyst*, 140(5), 1535-42 (2015)中。Walsh等人的参考文献也证实了在光热应用中可以实现的一些控制。

[0492] 实施例21

通过微波诱导的颗粒过热实现的热切割

本实施例描述了微波诱导的颗粒过热用于促进热变性(诸如dsDNA变性、逆-Michael反应、逆-第尔斯-阿尔德和其它消除)以经由热敏感的可切割的接头释放可计数部分的用途，因为使用低功率微波辐射可以加速免疫测定检测。这样的热敏感的可切割的接头可以用在例如DMF芯片中，如本文所述。

[0493] 在该实施例中，正交地官能化的短dsDNA区段(诸如具有在40-55°C范围内的双链 T_m 的15 bp序列)的形成充当热释放剂。dsDNA区段可以与抗体(经由附接化学诸如巯基-马来酰亚胺相互作用)和26 nm羧基化的聚苯乙烯纳米颗粒(NP)(诸如可以得自Bangs Labs (Fishers, IN, USA)的那些，经由附接化学诸如胺活化的羧酸化学)反应。26 nm NP具有528.7 μ eq/g的表面电荷和68.4平方Å/组的停靠面积(按照生产商信息)。所述抗体和纳米颗粒通过dsDNA区段结合，所述dsDNA区段形成热触发的可释放的接头。使用技术诸如微波辐射来触发颗粒过热和局部温度梯度，可以切割热接头。

DNA 序列 1 (10) (SEQ ID NO: 9): H₂N-5' CAA GCC CGG TCG TAA3'

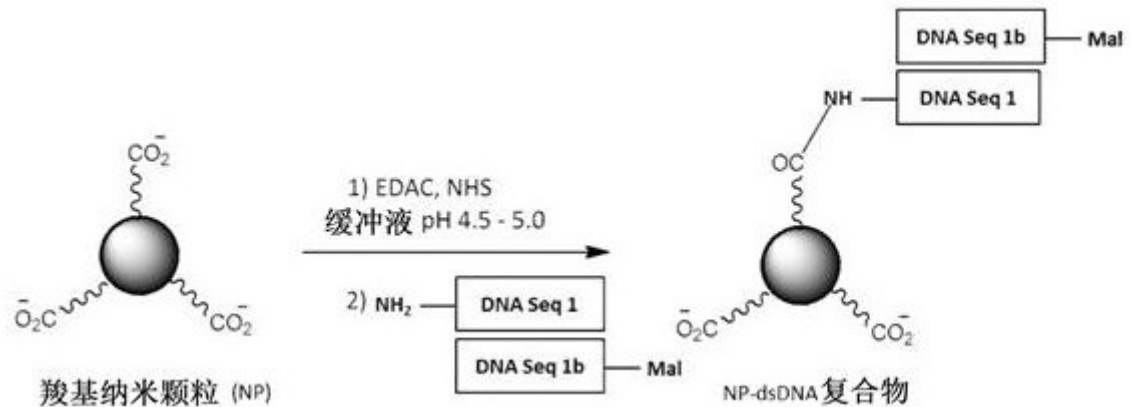
DNA 序列 1b (11) (SEQ ID NO: 10): 马来酰亚胺 -5' TTA CGA CCG GGC TTG3'

dsDNA 序列 (12) (SEQ ID NO: 9 - 正向链(顶); SEQ ID NO: 10 - 反向链(底)):

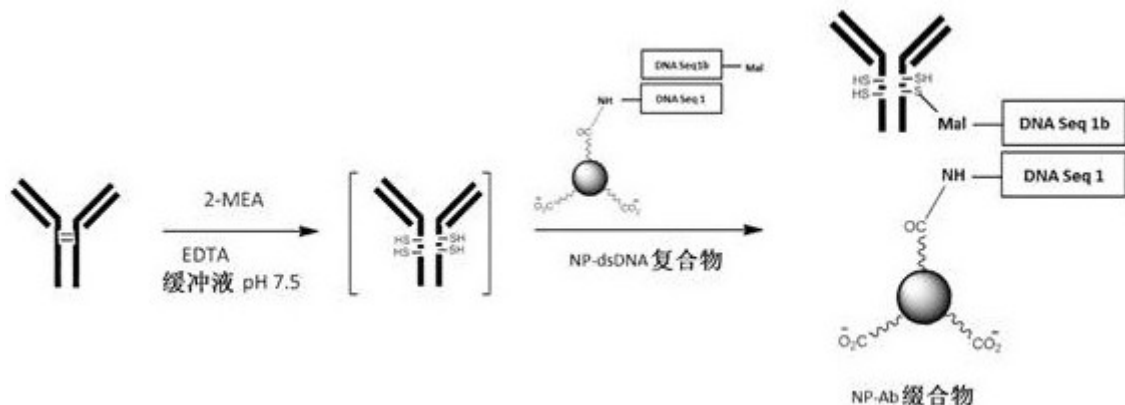
H₂N-5' CAA GCC CGG TCG TAA3'

3' GTT CGG GCC AGC ATT5'-马来酰亚胺。

[0494] 正交地官能化的互补DNA序列复合物的退火: 可以将大约100 μ M DNA序列1 (SEQ ID NO: 9) 在PBS (pH 7.5) 中的溶液与在PBS (pH 7.5) 中的1.0摩尔当量的DNA序列1b (理论T_m 51.6 $^{\circ}$ C, 按照Integrated DNA Technologies寡物分析仪工具) (SEQ ID NO: 10) 混合, 并放在60 $^{\circ}$ C的加热块中30分钟, 随后历时2小时缓慢冷却至室温。通过注射整个退火体积使用10 mM PBS (pH 7.2) 将得到的dsDNA产物在TosoH G3000SW柱 (7.8 mm x 300 mm) 上纯化。使用0.5 mL Amicon过滤器浓缩器减小洗脱液体积。通过A260吸光度确定最后的dsDNA浓度。下面描绘了反应方案 (“Mal” 是马来酰亚胺)。

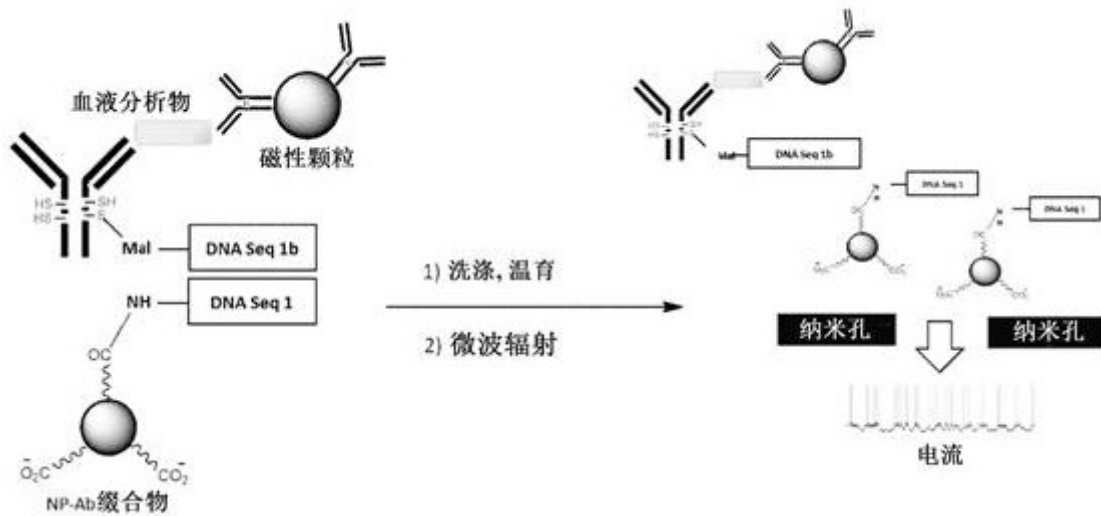


[0495] 羧基-聚苯乙烯纳米颗粒的活化和双链DNA的添加: 如在实施例5中在“羧基-聚苯乙烯纳米颗粒的活化”部分下所述, 将羧基纳米颗粒预活化。通过结合的DNA链的热变性、颗粒洗涤、荧光地标记的互补DNA序列 (诸如AlexaFluor546-5' -TTA CGA CCG GGC TTG3' (SEQ ID NO: 11)) 的退火, 确定NP上的DNA负载, 并使用荧光显微镜定量。



[0496] 抗体还原和与NP-dsDNA复合物的缀合: 如在实施例5中在“抗体还原”部分下所述, 将抗体还原。可以将还原的抗体立即用于偶联至NP-dsDNA复合物。将得到的缀合物在6,500 g离心, 并通过倾析将上清液除去。将洗涤操作用PBS (pH 7.5) 重复5次以从纳米颗粒除去任何游离的抗体。使用荧光地标记的抗原与给定的抗体, 可以定量活性抗体与纳米颗粒掺入

比。使用紫外-可见光光谱法(600 nm)确定缀合物NP浓度(%固体)。通过SEM检查颗粒缀合物,并使用ZetaSizer确定大小/电荷分布。



[0497] 微波诱导的颗粒过热和纳米孔计数免疫测定:以上方案解释了利用热变性的抗体-纳米颗粒缀合物(在上面描述了其制备)的纳米孔计数测定。使用分析物捕获剂包被的磁性微粒可以制备夹心型免疫测定,其中将血液分析物与磁性微粒一起温育,洗涤,并与所述的抗体-纳米颗粒缀合物一起温育。使用微波辐射在颗粒表面附近产生局部温度梯度,可以诱导颗粒过热。可以使用颗粒过热方法诸如在Dutz和Hergt (Nanotechnology, 25: 452001 (2014))中综述的那些。这些技术在免疫测定场合中对局部热变性的适应可以提供释放计数部分(诸如纳米颗粒)的方法。在除去磁性微粒以后,在穿过纳米孔后将计数部分(纳米颗粒)计数。

[0498] 实施例22

纳米孔计数数据

本实施例描述了多种标签(例如,具有聚乙二醇的ssDNA杂种分子(DNA-星)、dsDNA、用DBCO标记的dsDNA和PAMAM琥珀酰胺酸树枝状聚合物)的纳米孔计数数据。完成了这些不同标签与不同大小纳米孔一起的应用,以提供纳米孔优化。将不同的分子聚合物标记悬浮于适当的盐缓冲液中并使用标准的流体格网单元盒检测。

[0499] 使用自制仪器记录电流-电压($i-V$)记录(电压测定数据)和电流-时间($i-t$)记录。采用被称作CUSUM的计算机软件程序运行获得的数据并基于用户的阈值输入来检测事件。通过检测尽可能多的事件和为了特殊目的以后过滤,使主观性在评估中的任何影响最小化。

[0500] 用添加至膜的顺侧的标签执行初步实验。将200 mV的电偏置施加于标记溶液,并使用Axopatch 200B放大器和CUSUM软件监测电流阻断。

[0501] 已知小分子可以非常快速地穿过纳米孔,除非孔径限制它们的通过。快速事件的电流阻断可以由于系统的有限带宽而变形。特定系统甚至可以完全不会检测到较快的分子。

[0502] 在我们的研究中,仅检测到较大的聚合物和用大基团修饰剂标记的分子。实验条件和可检测的事件的数目显示在表3中。

[0503] 表3

聚合物	C 浓度 (nm)	背景电解质	电解质浓度(M)	pH	膜厚度 (nm)	纳米孔直径(nm)	检测电压 (mV)	通过 CUSUM 检测到的事件
50 bp dsDNA 对照	60	LiCl	3.6	8.0	10	3.9	200	414
DBCO 主链	96	LiCl	3.6	8.0	10	3.9	200	594
dsDNA 星	20	LiCl	3.6	8.0	10	3.9	200	5589
PMMAM(第6代)-琥珀酸	100	KCl	1.0	10	10	7.8	100	264
							150	1122
							200	1322

[0504] 这些数据证实,DNA树枝状聚合物、聚合物和PAMAM树枝状聚合物可以用作固态纳米孔传感器的检测标记。

[0505] 实施例23

生物分子的纳米孔区分

在该实施例中,使用纳米孔来区分生物分子(例如,dsDNA星、DBCO修饰的dsDNA和常规dsDNA)。该方法可以用于使用不同标签类型的多路复用。

[0506] 本实施例采用:含有在中央(碱基对编号25)的分支点的50 bp寡核苷酸,在所述分支点处共价地连接单链寡核苷酸(DNA-星);含有在中央(碱基编号25)的二苄基环辛炔(DBCO)修饰的双链50 bp寡核苷酸;和5'-巯基修饰的双链DNA寡核苷酸。

[0507] 使用三种不同的SiN_x纳米孔在3.6 M LiCl缓冲液中分析这些不同的经修饰的DNA分子。用4.0 nm直径孔分析DNA-星分子;用3.7 nm直径孔分析DBCO修饰的DNA;用4.2 nm直径孔分析巯基修饰的DNA。相对于纳米孔持续时间(μ sec)绘制电流阻断水平(pA),以便显示纳米孔区分三种不同生物分子的能力。在群体水平,三种不同的标记似乎是可区分的,如散布图中的不同图案差异所证实的(图24A-24C)。各个事件的实时鉴别需要额外水平的阻断水平和时间信息作为从噪音区分信号的方式。区分不同纳米孔标记的能力证实,纳米孔可以用于不同测定中的多路复用。

[0508] 实施例24

定性分析

下述实施例描述了进行定性测定的方法。基本上,在该实施例中,使用构建体来证实DMF芯片上的测定的原理,并将所述构建体切割,并将标记释放,然后使用纳米孔计数,从而随着它穿过纳米孔转移而产生信号,因而指示两个特异性结合成员对(抗生蛋白链菌素和生物素)的结合,其中该切割和dsDNA标记的随后计数与在测定过程中已经发生的特异性结合相关联。此外,进行适当的对照实验以证实从标记(对其在纳米孔转移测量过程中计数)产生的信号是由于在测定过程中已经发生的特异性结合事件,而不是与引入测定流程中的巯基切割试剂的存在相关联。如下进行实验的细节。

[0509] 使用DMF的巯基介导的切割:使用含有可切割的二硫键的生物素-标记的双链DNA(实施例17的(6))作为纳米孔检测/计数的靶标。结合测定包括将生物素DNA结合至DMF芯片上的抗生蛋白链菌素磁性微粒,继之以巯基介导的化学切割步骤(参见图25)。DMF芯片上的试剂布置显示在图27中。将经切割的DNA靶标(与结合至抗生蛋白链菌素磁体颗粒的物质分离)转移至含有固态氮化硅(SiN_x)膜的纳米孔流体格网单元,所述固态氮化硅(SiN_x)膜具有通过受控的介质击穿建立的预钻纳米孔(H. Kwok, 等人, *PLoS*, 9(3), 2014)。使用开放源CUSUM软件分析包(NIST)计数和分析DNA靶标材料。

[0510] 将适当的试剂加载到含有8个试剂蓄池的玻璃DMF芯片(3" X 2" X 0.0276")上。除

了废物蓄池以外,每个蓄池含有约5 μ L每种试剂。试剂的浓度如下:11 μ M生物素-SS-DNA在PBS(pH=7.2)中的溶液;10 mg/mL(w/v)M-270 2.7 μ m抗生蛋白链菌素包被的磁性微粒(Life Technologies);PBS洗涤缓冲液(pH=7.2)+ 0.05%ETKT(乙烯四-KIS(乙氧基化物-嵌段-丙氧基化物)四), 50 mM三-(2-羧基乙基)膦(TCEP)。分配的DMF微滴的近似大小为1.5 μ L。

[0511] 将M-270抗生蛋白链菌素包被的微粒的一个微滴与dsNP-31-SS-生物素的1个微滴一起分配并混合约40分钟。通过组合2个微滴完成混合,并在12个电极上面的DMF芯片上以环状图案移动(3 X 4)。将底磁体接合以收集微粒,并将上清液移动至废物蓄池。接着,将PBS/ETKT缓冲液的两个微滴分配并移动至微粒块,然后将其再悬浮于溶液。将混悬液混合5分钟,然后将磁体再次接合并将上清液移除至废物蓄池。将颗粒洗涤步骤重复共11次,同时将混合时间逐渐增加至45分钟。将最后一次洗涤上清液移动至空蓄池。将PBS/ETKT的另外5个微滴移动至相同蓄池。在纳米孔分析的准备中,将蓄池中的洗液和PBS/ETKT使用34-AWG非金属注射器(Microfil 34-AWG)取出并转移至1.5 mL Eppendorf试管。通过将TCEP试剂的2个微滴移动至微粒块并混合45分钟,启动切割。将底磁体接合,并将上清液(含有经切割的DNA)移动至空蓄池。将PBS/ETKT洗涤缓冲液的另外5个微滴移动至相同蓄池。在纳米孔分析的准备中,将最后的提取物使用34号非金属注射器从DMF芯片取出并转移至1.5 mL Eppendorf试管。将切割洗脱液用微量离心机离心30秒并在磁性支架中放置1分钟以除去任何痕量微粒。

[0512] 纳米孔分析:使用嵌入TEM窗口(0.05 μ m x 0.05 μ m)中的10 nm厚的SiN_x膜(Norcada NT0052,低应力SiN_x)的受控介质击穿(CBD),实现纳米孔制造。该方法能够以高精度和最小成本产生小直径固态孔。将TEM-SiN_x膜放在含有两个缓冲液隔室的聚四氟乙烯(PTFE)流体格网单元中,并使用两个有机硅弹性体垫圈密封。所述流体格网单元含有在所述格网单元的底中的16 μ L体积通道,其将较上隔室中的盐溶液连接至纳米孔膜。为了纳米孔制造,将流体格网单元首先用脱气的乙醇填充,用脱气的去离子水交换,然后用脱气的0.5 M KCl填充,用在18 M Ω 去离子水中的碳酸氢钠缓冲至pH 10。使用8V的偏置电压使用放大器进行制造。使用银/氯化银丝连接流体格网单元的两个侧面。如在Kwok等人中所述,当设置8V的固定电压时,所述电流实时表现出电容(电流的减小)。当电流增加时,从格网单元除去功率。用于制造的取样速率= 25 KHz。泄漏电流的增加指示孔的形成,因此关闭电压。从以下基于电导的方程式确定孔直径:

$$G = \sigma \left(\frac{4L}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right)^{-1}$$

其中G = 电导, σ = 体积电导率(对于KCl,测得12.35 S/m),L = 膜的厚度(10 nm), d = 孔直径(S. Kowalczyk, A. Grosberg, Y. Rabin, C. Dekker, *Nanotech.*, 22, 2011)。通过产生I-V曲线,针对欧姆性能检查纳米孔。测量的纳米孔直径被确定为4.4 nm,并随后用于检测经切割的ds-SS-DNA靶标。

[0513] 将制造盐缓冲液用3.6 M LiCl替换,所述3.6 M LiCl用作用于检测转移事件的感知缓冲液。将头段放在Axopatch 200B放大器和银/氯化银(其连接至容纳纳米孔膜的流体格网单元)之间。

[0514] 将约0.2 μ L TCEP切割的ds-DNA靶标用1.8 μ L PBS缓冲液(这代表TCEP-切割洗脱液

的10倍稀释度)稀释,并将整个体积加载和混合进纳米孔格网单元隔室,其含有大约30 μ L 3.6 M LiCl盐溶液。将最后的DMF洗涤洗脱液用作阴性切割对照(这没有稀释)。分别针对TCEP洗脱液和阴性对照将DNA转移的数目测量23和65分钟,并转化成通量率(秒⁻¹)。在图28中描绘的结果证实,使用DMF成功地从M-270抗生蛋白链菌素颗粒切割ds-SS-DNA靶标,并使用固态纳米孔作为检测器进行检测。将SNR确定为21.9,如从纳米孔通量率测得的。

[0515] 数据分析: 首先使用在Kwok等人,“Nanopore Fabrication by controlled Dielectric Breakdown”Supplementary Information Section 8和Kwok, H.; Briggs, K.;和Tabard-Cossa, V.;“Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown”- PLoS ONE 9 (3): e92880 (2014)中提及的以下方程式,在实验性测试条件下计算在双链DNA转移事件中发现的预期电流变化,确定转移事件的数目

$$\Delta G = \frac{\sigma \pi d_{DNA}^2}{4L} \quad (S1)。$$

[0516] 使用该预期电流阻断值,针对可接受的预期电流阻断事件在视觉上或手工地扫描实验性纳米孔输出的二进制文件数据。使用这些事件,应用和执行CUSUM纳米孔软件所需的阈值(Threshold)和滞后(Hysteresis)参数。使用cusumtools readevents.py软件并过滤大于1000 pA的阻断事件(如从第一次计算确定的),进一步分析来自该软件的输出。从readevents.py分析工具确定通量事件、事件之间的时间和其它计算。使用JMP软件(SAS Institute, Cary, North Carolina)对CUSUM产生的数据做出另外计算。应当理解,该阈值设置方法是用于数据分析和设置阈值的一个方案,并且本发明不限于该方法,并且还可以使用本领域技术人员已知的其它这样的方法。

[0517] 总结: 本实施例描述了通过进行本文所述的步骤过程实现的定性测定。使用可切割的接头缀合物进行直接测定,如在实施例17中所述,具有基于巯基的切割步骤,如在图25中所示。应当理解,用于进行这样的测定的其它可切割的接头方案还可以包括,但不限于,多种其它接头切割方法,从而允许计数多种标签,如本文所述。例如,除了在实施例17中描述的方法以外,这样的其它替代切割方法和/或试剂可以包括在实施例16、实施例18、实施例19、实施例20和实施例21中描述的那些,以及本文描述的和在本领域技术人员已知的其它切割方法。还理解,尽管在本实施例(实施例24)中证实的测定形式代表直接测定,但是同样可以实现其它形式诸如夹心免疫测定形式和/或各种竞争性测定形式(诸如本领域技术人员已知的),以使用所述方法进行测定。

[0518] 例如,如在实施例9中所述的用于检测TSH(促甲状腺激素)的夹心免疫测定形式表现出在低成本DMF芯片上进行这样的测定的能力。另外,使用多种异双官能的可切割的接头诸如在实施例1、实施例2、实施例3、实施例4、实施例5和实施例6中描述的那些,以及本领域技术人员以其它方式已知的其它可切割的接头,可以合成许多不同的生物缀合试剂,其可以用于产生免疫缀合物或具有可切割的接头的其它有活性的特异性结合成员。通过方法诸如在实施例3、实施例4、实施例5和实施例6中描述的那些,以及通过本领域技术人员已知的方法,可以合成可用于实践本发明的免疫缀合物。另外,实施例8显示了在低成本芯片上的各种流体微滴操作的功能性,其可以促进进行各种测定形式所需的各种步骤,所述测定形

式包括夹心和竞争性测定形式,以及本领域技术人员已知的它们的其它变体。实施例11显示了纳米孔的制造,其可以用于在测定中计数可切割标记,但是应当理解,本领域技术人员已知的用于纳米孔制造的其它方法也可以用于该目的。实施例16也代表可用于进行测定的另一种构建体,在其中实现切割,从而导致可计数的标记被释放,从而可使用在该实施例内所述的纳米孔计数方法计数。

[0519] 实施例22显示了通常可以如何实现计数从而能够测量与穿过纳米孔的多种标记的存在有关的转移事件。图29显示了信号阈值的概念,从而能够操纵计数测定中数据的特性。图28显示了定性测定数据,其代表使用在该实施例内描述的这类测定方法可以用于确定分析物的存在的数据类型。还理解,尽管在该特定实施例中将dsDNA用作标记,还可以利用其它标记,诸如在实施例5和/或实施例22中描述的标记,包括、但不限于纳米珠子、树枝状聚合物等。通过在本申请中描述的各种实施例或否则通过本领域技术人员已知的方法,可以合成产生适当试剂所需的这类构建体。

[0520] 实施例25

定量分析

下述实施例描述了用于进行定量测定的方法。基本上,在该实施例中,和作为实施例24的延伸,产生标准曲线从而证实,增加的量的计数标记(在该情况下,可计数的标记是dsDNA分子)在标准曲线上与在测定(结合)步骤中已经结合的特异性结合剂的量相关联(后者又与原始样品中存在的分析物的量相关联)。该特定实验的标准曲线可以参见图31、图32、图34(基于各种不同的数据分析方法)或图34(其依赖于通量以产生标准曲线)。在后一种情况下,在图34中所示的测量方法是基于事件/时间(计数事件的通量),但是应当理解,还可以使用其它测量方法来产生与在给定的样品中测量的分析物浓度的量相关的标准曲线。进行的实验的细节如下。

[0521] **纳米孔制造:** 使用嵌入TEM窗口(0.05 μm x 0.05 μm)中的10 nm厚的SiN_x膜(Norcada NT0052,低应力SiN_x)的受控介质击穿(CBD),实现纳米孔制造,因为该方法能够以高精度和最小成本产生小直径固态孔。将TEM-SiN_x膜放在含有两个缓冲液隔室的聚四氟乙烯(PTFE)流体格网单元中,并使用两个有机硅弹性体垫圈密封。所述流体格网单元含有在所述格网单元的底中的16 μL 体积通道,其将较上隔室中的盐溶液连接至纳米孔膜。为了纳米孔制造,将流体格网单元首先用脱气的乙醇填充,用脱气的去离子水交换,然后用脱气的0.5 M KCl填充,用在18 M Ω 去离子水中的碳酸氢钠缓冲至pH 10。使用8V的偏置电压使用放大器进行制造。使用银/氯化银丝连接流体格网单元的两个侧面。如在Kwok等人中所述,当设置8V的固定电压时,所述电流实时表现出电容(电流的减小)。当电流增加时,从格网单元除去功率。用于制造的取样速率为25 KHz。泄漏电流的突然增加指示孔的形成,因此关闭电压。用3.6 M LiCl(pH=8.3)替换0.5 M KCl缓冲液。

[0522] 从以下基于电导的方程式确定孔直径:

$$G = \sigma \left(\frac{4L}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right)^{-1},$$

其中G = 电导, σ = 体积电导率(对于LiCl,测得16.06 S/m), L = 膜的厚度(10 nm), d = 孔直径(S. Kowalczyk, A. Grosberg, Y. Rabin, C. Dekker, Nanotech., 22,

2011)。通过产生I-V曲线,针对欧姆性能检查纳米孔。测量的纳米孔直径被确定为4.8 nm,并随后用于检测DNA校准标准。

[0523] DNA剂量-响应: 将DNA标准物用作校准物以通过确定纳米孔通量率随着DNA浓度增加的变化来观察剂量-响应曲线。这产生了标准曲线,其可以用于在免疫测定中定量切割的DNA标记。将2 μ l 1.5 μ M 100 bp DNA标准物(ThermoScientific)移入含有30 μ l 3.6 M LiCl盐溶液的PTFE流体格网单元中,以得到94 nM DNA的终浓度。在纳米孔分析之前通过将溶液上下抽吸几次来混合试剂。对格网单元施加+200 mV的DC偏置并监测电流阻断60分钟。使用CUSUM分析软件表征电信号和计数速率。将该操作重复2次以得到标准曲线上的另外2个点:182 nM和266 nM。为所有三种标准品显示了在不同时间段的电流阻断——对于94 nM为41秒(图30A);对于182 nM为24秒(图30B);对于266 nM为8秒(图30C)。对于图30A、图30B和图30C,分别根据经验估计基线噪音为大约900 pA、900 pA和1,000 pA。

[0524] 将来自运行的数据用于产生三种不同类型的剂量-响应曲线——在固定时间量(5分钟)内的事件数目(图31);固定事件数目(200个事件)所需的时间(图32);和每单位时间的事件(图33)。这些曲线中的每一个可以用作标准曲线用于定量的基于纳米孔的免疫测定,其中使用DNA作为标签。类似地,可以使用其它标记来定量各种分析物,诸如树枝状聚合物、聚合物、纳米颗粒等。

[0525] Seq31-SS-生物素DNA剂量-响应: 使用合成的DNA构建体Seq31-SS-生物素作为源材料来产生剂量-响应曲线(图47)。该靶标可以用于定量经切割的标记NP-Seq31-SS-生物素,其在定性测定中从抗生蛋白链菌素珠子切割。因为该材料具有与经切割的标记Seq31-SS-生物素大约相同的分子量和电荷密度,可以将它用在校正曲线中以使用TCEP和/或DTT定量来自抗生蛋白链菌素微粒的经切割的靶标。

[0526] 数据分析: 首先使用在Kwok等人,“Nanopore Fabrication by controlled Dielectric Breakdown”Supplementary Information Section 8和Kwok, H.; Briggs, K.;和Tabard-Cossa, V.;“Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown”- PLoS ONE 9(3): e92880 (2014)中提及的以下方程式,在实验性测试条件下计算在双链DNA转移事件中发现的预期电流变化,确定转移事件的数目

$$\Delta G = \frac{\sigma \pi d_{DNA}^2}{4L} \quad (S1)。$$

[0527] 使用该预期电流阻断值,针对可接受的预期电流阻断事件在视觉上或手工地扫描实验性纳米孔输出的二进制文件数据。使用这些事件,应用和执行CUSUM纳米孔软件所需的阈值(Threshold)和滞后(Hysteresis)参数。使用cusumtools readevents.py软件并过滤大于1000 pA的阻断事件(如从第一次计算确定的),进一步分析来自该软件的输出。从readevents.py分析工具确定通量事件、事件之间的时间和其它计算。使用JMP软件(SAS Institute, Cary, North Carolina)对CUSUM产生的数据做出另外计算。应当理解,该阈值设置方法是用于数据分析的一个方案,并且本发明不限于该方法,并且还可以使用本领域技术人员已知的其它这样的方法。

[0528] 总结: 本实施例描述了通过进行本文所述的步骤过程实现的定量测定。使用可切

割的接头缀合物进行直接测定,如在实施例17中所述,具有基于巯基的切割步骤,如在图25中所示。应当理解,用于进行这样的测定的其它可切割的接头方案还可以包括,但不限于,多种其它接头切割方法,从而允许使用纳米孔计数多种标签,如本文所述。例如,除了在实施例17中描述的方法以外,这样的其它切割方法可以包括,但不限于,在实施例18、实施例19、实施例20和实施例21中描述的那些,以及本文描述的和本领域技术人员已知的其它方法。还理解,尽管在本实施例(实施例25)中证实的测定形式代表直接测定,但是同样可以实现其它形式诸如夹心免疫测定形式和/或各种竞争性测定形式(诸如本领域技术人员已知的)来进行测定。

[0529] 例如,如在实施例9中所述的用于检测TSH(促甲状腺激素)的夹心免疫测定形式表现出在低成本DMF芯片上进行这样的测定的能力。另外,使用多种异双官能的可切割的接头和通过方法(诸如在实施例1、实施例2、实施例3、实施例4、实施例5和实施例6中描述的那些)合成的缀合物,以及通过本领域技术人员已知的方法可以合成的其它可切割的接头或缀合物,本领域技术人员可以合成许多不同的生物缀合试剂,其可以用于产生免疫缀合物或具有可切割的接头的其它有活性的特异性结合成员。另外,实施例8显示了在低成本芯片上的各种流体微滴操作的功能性,其可以促进进行各种测定形式所需的各种步骤,所述测定形式包括夹心和竞争性测定形式,以及本领域技术人员已知的它们的其它变体。实施例16也代表可用于进行测定的另一种构建体,在其中实现切割,从而导致可计数的标记被释放,从而可使用在该实施例内所述的纳米孔计数方法计数。

[0530] 实施例22显示了通常可以如何执行计数从而能够测量与穿过纳米孔的标记的存在有关的转移事件。图29显示了信号阈值的概念,从而能够操纵计数测定中数据的特性。图31、32和33显示了定量测定数据输出,其代表使用在该实施例内描述的这类测定方法可以用于确定分析物的量的数据类型。图34显示了从已经使用化学方法切割的构建体产生的标准曲线。还理解,尽管在该特定实施例中将dsDNA用作标记,还可以利用其它标记,诸如在实施例5中描述的标记,包括、但不限于纳米珠子、树枝状聚合物等。这样的构建体可以通过本领域技术人员已知的方法合成。

[0531] 实施例26

纳米孔电场模拟

对在硅模块中使用的提议纳米孔膜设计执行一系列COMSOL模拟运行,以研究SiO₂ via的大小对抗衡离子浓度和穿过理论10 nm直径纳米孔的电渗流速率的影响。SiO₂顶层用于多个目的:1)给SiN_x膜提供绝缘层,且由此减小纳米孔的电容噪音;2)增加硅基底内的SiN_x膜的稳健性和强度;3)减小暴露于溶液的SiN_x面积的大小,由此改善所述孔在来自受控介质击穿(CBD)过程的膜上的定位。使用电场模拟来确定SiO₂层对局部抗衡离子浓度和穿过孔的电渗流的影响。

[0532] 参考图35,蚀刻硅基底(1)以产生顺和反隔室,其位于SiN_x膜上面和下面。SiN_x膜(50 μm x 50 μm)(2)位于300 μm厚的SiO₂底层和300 μm厚的SiO₂顶层(3)之间。制造所述顶层以形成SiO₂ via(4),其允许在CBD过程中形成纳米孔。通过模拟来确定SiO₂ via的最佳直径。

[0533] COMSOL模拟结果:COMSOL电场模拟使用基于材料、静电学、分子运输和层流性质的物理模型。电势是基于Poisson方程式;离子通量是基于Nernst-Planck方程式;流体速度是

基于Stokes方程式。用于模拟的物理参数在表1中定义,显示在图36中。

[0534] 在孔附近的抗衡离子浓度梯度的COMSOL结果显示在图37中,并表明当SiO₂ via直径>50 nm直径时离子浓度的极小至无影响。在50 nm以下,导致净电荷积累在孔腔附近。在25 nm的直径观察到最严重的效应,其中大离子梯度形成在孔附近。结果表明当纳米孔离SiO₂壁小于25-50 nm时SiO₂表面的相当大的影响。

[0535] 模拟抗衡离子穿过孔的电渗流速率作为确定SiO₂层可能对纳米孔感知具有的任何影响的方式(图38)。较高电渗流速率随较大via直径(100- 4,500 nm)而发生。对于50 nm SiO₂ via观察到穿过孔的流率的下降,继之以25 nm via的显著下降。

[0536] 如在图39中所示,相对于via直径的穿过孔的电导测量结果表明高于100 nm的饱和曲线,电导随着via直径的大小从100 nm减小至25 nm而减小。

[0537] 实施例27

将纳米孔模块集成进数字微流体(DMF)模块中

将纳米孔模块定位在DMF模块的一个侧面上。孔存在于DMF模块中以允许液体从DMF模块运输至纳米孔模块用于孔建立和分析物检测(例如,参见图40)。

[0538] 来自纳米孔模块的一个电极终止在纳米孔模块中的流体体积内。其它电极终止在DMF模块中的流体体积内。该电极穿过DMF模块中的第二个孔。为了证实液体能够穿过DMF模块内的孔移动,在液体移动就位以后将扁纸片压在芯片的外表面上。该纸的润湿表明,液体能够通过毛细管力从DMF模块移动至位于该孔上面的另一个模块(图41)。

[0539] 参考图42,给DMF模块配备Ag/AgCl电极用于控制纳米孔制造。在该方案中,在纳米孔模块上的液体体积是LiCl的暴露(open-air)微滴。将该液体直接分配在纳米孔模块上,并将电极末端悬浮于该微滴内。

[0540] 使用DMF技术使样品移动至DMF模块中的孔内。样品被动地穿过孔迁移以变得暴露于用于纳米孔建立的纳米孔模块。将纳米孔模块密封至DMF模块(例如使用PDMS、压力、蜡等),分离保留在每个模块内的液体体积。图45显示了在纳米孔制造过程中随时间变化的电流。

[0541] 一旦建立纳米孔,使用调节过程(随时间改变电压)来物理地改变纳米孔和清洁信号。该过程会改善I-V曲线中的对称性。之前和之后I-V曲线分别显示在图46A和46B中。

[0542] 实施例28

计数标记和孔径分析

在不同的条件组下使用双链DNA运行一组实验以分析和证实与孔径和计数标记大小有关的某些属性。在这些实验中,探究了多种参数,包括检测电压、DNA长度、DNA浓度、盐浓度和盐组成、膜材料、膜厚度、纳米孔直径和其它因素。

[0543] 然后将数据集与信噪比关联地分析,并将该因素与计数标记大小(估计的分子直径)的相关各种孔径进行对比。例如,某些因素诸如膜材料和厚度在该组实验中保持恒定,而其它因素变化。

[0544] 从综合数据集分析,相对于在实验中确定的SNR(信噪比)绘制在计数标记平均直径和纳米孔大小之间的比率的平均值(图47)。图47一般地证实,有用的计数数据可以得自许多这样的比率,在该特定数据集中得自这样的比率的约0.4-0.8——近似地假定约2.0 nm的dsDNA的分子直径。从文献已知直链dsDNA是在该分子直径附近,并且分析假定DNA以它

的直链构象螺旋穿过孔。表4显示了计算的数据。

[0545] 表4

平均孔标记分子直径与孔的比率	SNR
0.645	27.5
0.556	53.7
0.476	12
0.714	23.7
0.803	17
0.645	22.5
0.8	20.2
0.588	17
0.69	55
0.476	23.5

[0546] 如以前在该实施例中提及的,当改变条件时,在该数据集中的一般范围表明,在该范围内可以得到具有合理信噪比的计数数据。此外,应当指出,本领域技术人员会认识到,可以利用其它计数标记分子直径与纳米孔直径比率来达到合理的SNR。另外,本领域技术人员可以认识到,一般而言,标记应当在它的分子直径的至少一个维度上小于纳米孔的尺寸从而能够穿过所述孔,或换言之,标记分子直径与纳米孔直径的该比率通常应当小于1,从而使得标记能够穿过所述孔,但是其中使用诸如在被称作纳米孔力光谱法的技术中描述的条件情况除外,其中将能量加给系统以促进在标记中发生构象变化,且因而允许它变形至允许发生这样的转移事件的水平以后穿过孔。

[0547] 本领域技术人员还应当理解,可以将其它标记用于计数在该实施例中描述的其它dsDNA,并且它们可以具有不同于在该图中所示行为的行为。此外,还应当理解,也可能从其它分子直径与纳米孔比率得到可接受的SNR以实现这样的标记的分子计数,并且电流阻断可以与这样的计数标记的分子直径相关,如在以下方程式中所述

$$\Delta G = \frac{\sigma \pi d_{DNA}^2}{4L} \quad (S1)$$

其可以在以下参考文献中找到:Kwok等人,“Nanopore Fabrication by controlled Dielectric Breakdown” Supplementary Information Section 8和/或Kwok, H.; Briggs, K.;和Tabard-Cossa, V.;“Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown”- PLoS ONE 9(3): e92880 (2014)。为了门控或阈值信号可以使用该方程式,如在该文件的实施例24和25中所述。

[0548] 在纳米孔计数实验的该综合集中改变的某些具体条件包括:

- 离子强度-3或3.6 M
- DNA长度- 10kbp, 50 bp或1kbp
- 使用的离子盐- LiCl或KCl
- 膜材料- SiNx (贯穿数据集恒定)
- 膜厚度- 10 nm (贯穿数据集恒定)

- DNA浓度- 在3 nM和约306 nM之间变化
- 电压-变化, 包括50-600 mV之间的增量
- 纳米孔直径- 多种孔径, 包括8.0、1.1、3.6、4.2、2.8、2.5、7.7、3.1、2.7、2.6、2.9和4.2 (都以纳米为单位)。

[0549] 可以得出结论, 各种条件(包括、但不限于这些)表明, 当按照Kwok等人在该实施例中提及的该方程式[Kwok等人, “Nanopore Fabrication by controlled Dielectric Breakdown” Supplementary Information Section 8和/或Kwok, H.; Briggs, K.; 和 Tabard-Cossa, V.; “Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown”- PLoS ONE 9 (3): e92880 (2014)]可计算的量施加电压时, 在可计数的标记小于孔直径的情况下可得到的条件可以造成横过所述孔的离子电流的通量的阻断。

[0550] 还理解, 可以应用这些条件来显示对于除了dsDNA以外的其它标记而言将以合理信噪比起作用的计数标记分子直径与孔直径比率, 所述其它标记包括、但不限于树枝状聚合物、半树枝状聚合物、纳米珠子、阴离子或阳离子聚合物、变性的线性化适体、带负电荷的或带正电荷的多肽或其它带电荷的聚合物或可计数的分子实体等。

[0551] 最后, 尽管已经关于本文的不同实施方案和具体实施例描述了本发明的不同方面和特征, 但是它们都可以常规地做出或实现, 应该理解, 本发明获得所附权利要求的整个范围内的保护。

[0552] 应当理解, 前述详细描述和附随实施例仅仅是示例性的, 且不应用作对本发明的范围的限制, 所述范围仅由所附权利要求和它们的等同方案限定。

[0553] 本领域技术人员会明白对公开的实施方案的不同变化和修改。可以在不脱离其精神和范围的情况下做出这样的变化和修改, 包括但不限于与化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、制剂或本发明的使用方法有关的那些。

[0554] 为了完整性的原因, 在以下编号的条款中阐述了本发明的不同方面:

条款1. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法, 所述方法包括: (a) 使所述样品与第一结合成员接触, 其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上, 且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物; (b) 使所述分析物与第二结合成员接触, 其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物, 且其中所述第二结合成员包含与其附接的可切割标签; (c) 除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员; (d) 切割与第二结合成员附接的标签, 所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物; (e) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签; 和(f) 评估穿过所述层转移的标签, 其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量, 或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0555] 条款2. 条款1的方法, 其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件, 且测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量, 其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量: i) 计数在设定的时间段内转移事件的数目, 并将所述转移事件的数目与对照关联; ii) 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联; 或iii) 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联, 其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准。

[0556] 条款3. 条款2的方法, 其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移

事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0557] 条款4. 条款1-3中的任一项的方法,其中所述方法涉及单个分子计数。

[0558] 条款5. 条款1-4中的任一项的方法,其中所述标签选自阴离子聚合物、阳离子聚合物、树枝状聚合物和纳米颗粒。

[0559] 条款6. 条款1或5中的任一项的方法,其中所述标签是基本上球形的或半球形的。

[0560] 条款7. 条款1-6中的任一项的方法,其中所述标签是基本上球形的且包含纳米颗粒。

[0561] 条款8. 条款1-7中的任一项的方法,其中所述标签是基本上球形的或半球形的且包含树枝状聚合物。

[0562] 条款9. 条款8的方法,其中所述树枝状聚合物是带正电荷的或带负电荷的。

[0563] 条款10. 条款5或7的方法,其中所述纳米颗粒包含带正电荷的纳米颗粒。

[0564] 条款11. 条款10的方法,其中所述纳米颗粒包含带负电荷的纳米颗粒。

[0565] 条款12. 条款1-11中的任一项的方法,其中所述第一结合成员和所述第二结合成员是抗体或受体。

[0566] 条款13. 条款1-12中的任一项的方法,其中所述第一结合成员是受体且所述第二结合成员是抗体,或其中所述第一结合成员是抗体且所述第二结合成员是受体。

[0567] 条款14. 条款1-12中的任一项的方法,其中所述第一结合成员是第一抗体且所述第二结合成员是第二抗体。

[0568] 条款15. 条款1-14中的任一项的方法,其中所述标签是带负电荷的,且所述转移包括跨所述层施加正电势由此穿过所述层转移所述标签。

[0569] 条款16. 条款1-14中的任一项的方法,其中所述标签是带正电荷的,且所述转移包括跨所述层施加负电势由此穿过所述层转移所述标签。

[0570] 条款17. 条款1-16中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)在以下装置中完成:微流体装置,基于微滴的微流体装置;数字微流体装置(DMF),基于表面声波的微流体装置(SAW),完全集成的DMF和纳米孔装置,或完全集成的SAW和纳米孔装置。

[0571] 条款18. 条款17的方法,其中DMF元件和纳米孔元件在所述完全集成的DMF和纳米孔装置中可操作地偶联,或SAW元件和纳米孔元件在完全集成的SAW和纳米孔装置中可操作地偶联。

[0572] 条款19. 条款17的方法,其中所述DMF装置或所述SAW装置通过基于卷对卷的印刷电子学方法制造。

[0573] 条款20. 条款18的方法,其中所述DMF元件或所述SAW元件通过基于卷对卷的印刷电子学方法制造。

[0574] 条款21. 条款17的方法,其中所述完全集成的DMF和纳米孔装置或所述完全集成的SAW和纳米孔装置包含微流体导管。

[0575] 条款22. 条款21的方法,其中所述微流体导管将所述DMF元件偶联至所述纳米孔元件,且所述微流体导管包含通过被动力或主动力诱导的流体流。

[0576] 条款23. 条款1-22中的任一项的方法,其中所述纳米孔是固态纳米孔或生物纳米

孔。

[0577] 条款24. 条款1-23中的任一项的方法,其中测量穿过所述层转移的标签的数目包括观察由所述标签与所述纳米孔的相互作用诱导的电流的变化。

[0578] 条款25. 条款24的方法,其中当所述电流变化具有超过阈值水平的量级时,所述分析物存在于所述样品中。

[0579] 条款26. 条款23的方法,其中所述方法还包括:将含有在步骤(d)中得到的标签的微滴运输至纳米孔装置,和横过存在于所述纳米孔装置中的纳米孔层放置所述微滴,使得所述微滴被所述纳米孔层分割且通过存在于所述纳米孔层中的纳米孔连接,其中所述标签存在于在所述纳米孔层的两个侧面上的微滴中。

[0580] 条款27. 条款26的方法,其中所述方法包括:将存在于所述纳米孔层的第一侧面上的标签横过所述纳米孔转移至所述纳米孔层的第二侧面,由此将所述标签收集在纳米孔层的第二侧面上的分割微滴中。

[0581] 条款28. 条款26的方法,所述方法还包括:将所述标签转移至所述纳米孔层的第一侧面,和确定存在于所述微滴中的标签的数目。

[0582] 条款29. 条款1-28中的任一项的方法,其中所述标签包含可切割的接头。

[0583] 条款30. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、第一特异性结合成员和第二特异性结合成员接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述第一特异性结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述第一特异性结合成员特异性地结合所述目标分析物,所述第二特异性结合成员包含可切割标签,且所述第二特异性结合成员特异性地结合所述目标分析物,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/目标分析物/第二特异性结合成员复合物;(b)除去未结合至所述固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物的第二特异性结合成员;(c)切割标签,所述标签附接到与所述固体支持物/第一特异性结合成员/目标分析物/第二特异性结合成员复合物中的第二特异性结合成员结合的经标记的分析物;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0584] 条款31. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含适体;(c)除去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体;(d)解离与所述分析物结合的适体(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(f)评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

[0585] 条款32. 条款31的方法,其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件,且测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件

之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准。

[0586] 条款33. 条款32的方法,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0587] 条款34. 条款31-33中的任一项的方法,其中所述方法涉及单个分子计数。

[0588] 条款35. 条款31-34中的任一项的方法,其中所述适体是DNA适体。

[0589] 条款36. 条款31-34中的任一项的方法,其中所述适体是RNA适体。

[0590] 条款37. 条款31-36中的任一项的方法,其中所述第一结合成员是抗体。

[0591] 条款38. 条款31-36中的任一项的方法,其中所述分析物是配体,且所述第一结合成员是受体。

[0592] 条款39. 条款31-38中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)在以下装置中完成:微流体装置,基于微滴的微流体装置,数字微流体装置(DMF),基于表面声波的微流体装置(SAW),完全集成的DMF和纳米孔装置,或完全集成的SAW和纳米孔装置。

[0593] 条款40. 条款39的方法,其中DMF元件和纳米孔元件在所述完全集成的DMF和纳米孔装置中可操作地偶联,或SAW元件和纳米孔元件在完全集成的SAW和纳米孔装置中可操作地偶联。

[0594] 条款41. 条款39的方法,其中所述DMF装置或所述SAW装置通过基于卷对卷的印刷电子学方法制造。

[0595] 条款42. 条款40的方法,其中所述DMF元件或所述SAW元件通过基于卷对卷的印刷电子学方法制造。

[0596] 条款43. 条款39的方法,其中所述完全集成的DMF和纳米孔装置或所述完全集成的SAW和纳米孔装置包含微流体导管。

[0597] 条款44. 条款43的方法,其中所述微流体导管将所述DMF元件偶联至所述纳米孔元件,且所述微流体导管包含通过被动力或主动力诱导的流体流。

[0598] 条款45. 条款31-44中的任一项的方法,其中所述纳米孔是固态纳米孔或生物纳米孔。

[0599] 条款46. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;和设置在所述第一基底和第二基底之间的纳米孔层,其中所述电极阵列被构造成将所述微滴定位成横过所述纳米孔层,使得所述微滴被所述纳米孔层分割成第一部分和第二部分,其中所述电极阵列的至少两个电极定位成横过所述纳米孔层,其中所述两个电极形成阳极和阴极,并在液体微滴定位成横过所述纳米孔层时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

[0600] 条款47. 条款46的装置,其中所述纳米孔层附接到所述第一基底和第二基底。

[0601] 条款48. 条款46的装置,其中所述纳米孔层附接到所述第一基底或所述第二基底。

[0602] 条款49. 条款46-48中的任一项的装置,其中所述电极是透明的。

[0603] 条款50. 条款46-49中的任一项的装置,其中所述电极以网格图案设置。

- [0604] 条款51. 条款46-50中的任一项的装置,其中所述定位成横过所述纳米孔层的电极阵列的至少两个电极侧接所述纳米孔层且没有定位成横过所述纳米孔层。
- [0605] 条款52. 条款46-51中的任一项的装置,其中所述电极是互相交叉的。
- [0606] 条款53. 条款46-51中的任一项的装置,其中所述电极阵列被构造成由电源激活,其中所述电源以相继方式激活所述电极。
- [0607] 条款54. 条款53的装置,其中相继方式包括将一个或多个电极打开或关闭。
- [0608] 条款55. 条款52-54中的任一项的装置,其中电源对所述电极阵列的激活由控制所述电源的处理器所执行的一组指令控制。
- [0609] 条款56. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;和设置在所述第一基底和第二基底之间的纳米孔层,其中所述电极阵列被构造成将所述微滴定位成横过所述纳米孔层,使得所述纳米孔层将所述微滴分割成第一部分和第二部分,其中所述电极阵列的至少一个电极与定位成横过所述纳米孔层的微滴的第一部分发生接触,且所述第二基底中的电极定位成接触定位成横过所述纳米孔层的微滴的第二部分,其中所述两个电极形成阳极和阴极,并在液体微滴定位成横过所述纳米孔层时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。
- [0610] 条款57. 条款56的装置,其中所述纳米孔层附接到所述第一基底。
- [0611] 条款58. 条款56或57中的任一项的装置,其中所述纳米孔层附接到所述第二基底。
- [0612] 条款59. 条款56-58中的任一项的装置,其中所述第一基底和/或第二基底是透明的。
- [0613] 条款60. 条款56-59中的任一项的装置,其中所述电极阵列是透明的。
- [0614] 条款61. 一种试剂盒,其包含条款46-60中的任一项的装置,或用于用在条款1-45中的任一项的方法中。
- [0615] 条款62. 条款61的试剂盒,所述试剂盒还包含另外的试剂,其中至少一种试剂包含通过穿过所述装置的纳米孔层的转移可以检测的标签。
- [0616] 条款63. 使用条款46-60中的任一项的装置的方法,或条款1-45中的任一项的方法,用于测量或检测存在于生物样品中的分析物或用于诊断患者或筛查血液供给。
- [0617] 条款64. 条款1-45中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)使用条款46-60中的任一项的装置完成。
- [0618] 条款65. 条款46-60中的任一项的装置的用途,或条款1-45中的任一项的方法的用途,在诊断患者或筛查血液供给的方法中或用于测量或检测存在于生物样品中的分析物。
- [0619] 条款66. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述经标记的分析物用可切割标签标记;(c)除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;(d)切割标签,所述标签附接到与所述结合成员结合的经标记的分析物;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标

签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0620] 条款67. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中结合成员被固定化在固体支持物上,且其中结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述经标记的分析物包含适体;(c)除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;(d)解离结合至所述经标记的分析物的适体,并穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e)评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

[0621] 条款68. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员用可切割标签标记;(b)使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c)除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d)切割标签,所述标签附接到与所述固定化的分析物结合的结合成员;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0622] 条款69. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员包含适体;(b)使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c)除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d)解离适体,所述适体结合至与所述固定化的分析物结合的结合成员,和穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e)评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

[0623] 条款70. 条款66或68的方法,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,且测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准。

[0624] 条款71. 条款67或69的方法,其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件,且测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准。

[0625] 条款72. 条款70或71的方法,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的

对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0626] 条款73. 条款66-72中的任一项的方法,其中所述方法涉及单个分子计数。

[0627] 条款74. 条款66、68、70、72或73中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)使用条款46-60中的任一项的装置完成。

[0628] 条款75. 条款67、69、71、72或73中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)使用条款46-60中的任一项的装置完成。

[0629] 条款76. 条款66、68、70、72、73或74中的任一项的方法,其中所述标签选自阴离子聚合物、阳离子聚合物、树枝状聚合物和纳米颗粒。

[0630] 条款77. 条款66、68、70、72、73或74中的任一项的方法,其中所述标签是基本上球形的或半球形的。

[0631] 条款78. 条款66、68、70、72、73或74中的任一项的方法,其中所述标签是基本上球形的且包含纳米颗粒。

[0632] 条款79. 条款66、68、70、72、73或74中的任一项的方法,其中所述标签是基本上球形的或半球形的且包含树枝状聚合物。

[0633] 条款80. 条款79的方法,其中所述树枝状聚合物是带正电荷的或带负电荷的。

[0634] 条款81. 条款79的方法,其中所述纳米颗粒包含带正电荷的纳米颗粒。

[0635] 条款82. 条款76或78的方法,其中所述纳米颗粒包含带负电荷的纳米颗粒。

[0636] 条款83. 条款66、68、70、72、73、74或76-82中的任一项的方法,其中所述结合成员是抗体或受体。

[0637] 条款84. 条款66、68、70、72、73、74或76-83中的任一项的方法,其中所述标签是带负电荷的,且所述转移包括跨所述层施加正电势由此使所述标签横过所述层转移。

[0638] 条款85. 条款66、68、70、72、73、74或76-84中的任一项的方法,其中所述标签是带正电荷的,且所述转移包括跨所述层施加负电势由此使所述标签横过所述层转移。

[0639] 条款86. 条款66、68、70、72、73、74或76-85中的任一项的方法,其中测量穿过所述层转移的标签的数目包括观察所述纳米孔上的标签的电流阻断效应。

[0640] 条款87. 条款86的方法,其中当所述电流阻断效应高于阈值水平时,所述分析物存在于所述样品中。

[0641] 条款88. 条款67、69、71、72、73或75中的任一项的方法,其中所述适体是DNA适体。

[0642] 条款89. 条款67、69、71、72、73或75中的任一项的方法,其中所述适体是RNA适体。

[0643] 条款90. 条款67、69、71、72、73、75、88或89中的任一项的方法,其中所述结合成员是抗体。

[0644] 条款91. 条款67、69、71、72、73、75、88或89中的任一项的方法,其中所述分析物是配体且所述结合成员是受体。

[0645] 条款92. 条款67、69、71、72、73、75或88-91中的任一项的方法,其中所述方法还包括:将含有所述标签的微滴运输至纳米孔装置,和横过存在于所述纳米孔装置中的纳米孔层放置所述微滴,使得所述微滴被所述纳米孔层分割且通过存在于所述纳米孔层中的纳米孔连接,其中所述标签存在于在所述纳米孔层的两个侧面上的微滴中。

[0646] 条款93. 条款92的方法,其中所述方法包括:将存在于所述纳米孔层的第一侧面上的标签横过所述纳米孔转移至所述纳米孔层的第二侧面,由此将所述标签收集在纳米孔

层的第二侧面上的分割微滴中。

[0647] 条款94. 条款92的方法,所述方法还包括:将所述标签转移至所述纳米孔层的第一侧面,和确定存在于所述微滴中的标签的数目。

[0648] 条款95. 条款67、69、71、72、73、75或88-94中的任一项的方法,其中所述方法还包括:将含有所述适体的微滴运输至纳米孔装置,和横过存在于所述纳米孔装置中的纳米孔层放置所述微滴,使得所述微滴被所述纳米孔层分割且通过存在于所述纳米孔层中的纳米孔连接,其中所述适体存在于所述纳米孔层的两个侧面上的微滴中。

[0649] 条款96. 条款95的方法,其中所述方法包括:将存在于所述纳米孔层的第一侧面上的适体横过所述纳米孔转移至所述纳米孔层的第二侧面,由此将所述适体收集在所述纳米孔层的第二侧面上的分割微滴中。

[0650] 条款97. 条款95的方法,所述方法还包括:将所述适体转移至所述纳米孔层的第一侧面,和确定存在于所述微滴中的适体的数目。

[0651] 条款98. 条款66-97中的任一项的方法,其中所述纳米孔是固态纳米孔或生物纳米孔。

[0652] 条款99. 条款1-45或63-98中的任一项的方法,其中所述第二结合成员还包含间隔物。

[0653] 条款100. 条款99的方法,其中所述间隔物包含硝基苄基、二硫代乙基氨基、6碳间隔物、12碳间隔物或3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐。

[0654] 条款101. 条款100的方法,其中所述间隔物包含硝基苄基,且所述标签是DNA分子。

[0655] 条款102. 条款100的方法,其中所述间隔物是二硫代乙基氨基,且所述标签是羧基化的纳米颗粒。

[0656] 条款103. 条款100的方法,其中所述间隔物是3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐,且所述标签是寡核苷酸。

[0657] 条款104. 条款103的方法,其中所述间隔物包含6碳间隔物或12碳间隔物,且所述标签是生物素。

[0658] 条款105. 条款104的方法,其中所述第二结合成员包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO: 1-11中的任一个所示的核苷酸序列。

[0659] 条款106. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含微流体模块和纳米孔模块;所述微流体模块包含电极阵列,其中所述电极阵列将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的第一转移位置,其中所述第一转移位置是在所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口处;所述纳米孔模块包含:第一毛细管通道;和第二毛细管通道;其中至少所述第一毛细管通道延伸至所述接口且邻近所述第一转移位置,并且定位成接收定位在所述第一转移位置处的流体微滴;其中所述第一毛细管通道与所述第二毛细管通道相交,其中纳米孔层定位在所述第一毛细管通道和第二毛细管通道之间所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道发生相交的位置。

[0660] 条款107. 条款106的装置,其中所述电极阵列将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的第二转移位置,其中所述第二转移位置是在所述微流体模块和所述纳米孔模

块之间的接口处,其中所述第二毛细管通道延伸至所述接口且邻近所述第二转移位置,并且定位成接收定位在所述第二转移位置处的流体微滴。

[0661] 条款108. 条款106的装置,其中所述第二毛细管通道在所述第二毛细管通道的一个或两个末端上的排出口或蓄池之间延伸。

[0662] 条款109. 条款108的装置,其中所述第二毛细管通道连接至在一个末端处的第一蓄池和在另一个末端处的第二蓄池。

[0663] 条款110. 条款109的装置,其中所述第一蓄池和/或所述第二蓄池包含流体,所述流体要定位成在所述第二毛细管通道内在所述相交处,所述流体促进所述纳米孔层的运行以驱动电流穿过所述纳米孔层的纳米孔。

[0664] 条款111. 条款109的装置,其中所述第一毛细管通道和/或所述第二毛细管通道在横过所述毛细管通道的长度的横截面宽度上变化,使得所述宽度与在所述相交处的任一侧上的宽度相比在所述相交处减小。

[0665] 条款112. 条款106的装置,其中所述第一毛细管通道包含第一对电极,且所述第二毛细管通道包含第二对电极,其中所述第一对电极定位在所述第一毛细管通道中且侧接所述纳米孔层中的纳米孔,且其中第二对电极定位在所述第二毛细管通道且侧接所述纳米孔层中的纳米孔。

[0666] 条款113. 条款107-112中的任一项的装置,其中所述微滴是包含要通过运输穿过所述纳米孔层中的纳米孔来计数的分子的微滴。

[0667] 条款114. 条款107的装置,其中所述流体微滴具有不同的组成且是第一微滴和第二微滴,所述第一微滴包含要通过穿过所述纳米孔横过所述纳米孔层运输来计数的分子,且所述第二微滴包含缺乏所述分子的导电流体,其中所述导电流体促进所述分子经由纳米孔横过所述纳米孔层的运输。

[0668] 条款115. 条款106-114中的任一项的装置,其中所述第一毛细管通道包含定位在所述纳米孔层的近端的第一电极,且所述第二毛细管通道包含定位在所述纳米孔层的近端的第二电极,其中所述第一电极和第二电极中的每一个暴露在所述毛细管通道中,使得它们与存在于所述毛细管通道中的流体发生接触,且其中当液体定位成横过所述第一毛细管通道和第二毛细管通道中的纳米孔层时,所述第一电极和第二电极运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。

[0669] 条款116. 条款106-115中的任一项的装置,其中所述第一转移位置和所述第一毛细管通道是在基本上同一个平面上,且其中所述流体微滴与所述第一毛细管通道的开口对齐。

[0670] 条款117. 条款106-115中的任一项的装置,其中所述第一转移位置是在比所述第一毛细管通道更高的平面处,且其中所述装置被构造成具有垂直端口,所述垂直端口用于将所述流体微滴向下转移至所述第一毛细管通道的开口。

[0671] 条款118. 条款117的装置,其中所述第一基底的第一表面包含在其上面设置所述电极阵列的第一区域和在其中形成所述第一微通道的第二区域,其中所述电极阵列是在这样的平面上:所述平面高于在其上面形成所述第一微通道的平面。

[0672] 条款119. 条款117的装置,其中所述第二基底包含在位于所述接口的侧边缘处的凹槽,其中所述凹槽在所述第一毛细管通道上面对齐并提供垂直端口,所述垂直端口用于

将位于所述转移电极处的微滴运输至所述第一毛细管通道的开口。

[0673] 条款120. 条款106-119中的任一项的装置,所述装置还包含与所述电极阵列间隔的单个电极,其中所述单个电极在所述第一转移位置处的所述电极阵列的至少一部分上面延伸,且与在所述第一转移位置处的所述电极阵列的至少一部分呈双平面构型。

[0674] 条款121. 条款107-119中的任一项的装置,所述装置还包含与所述电极阵列间隔的单个电极。

[0675] 条款122. 条款106-119中的任一项的装置,所述装置还包含与所述电极阵列间隔的单个电极,其中所述单个电极没有在所述第一转移位置上面延伸且没有与所述电极阵列呈双平面构型,其中通过使用共面电极使所述流体微滴移动至所述第一转移位置。

[0676] 条款123. 条款106-119中的任一项的装置,所述装置还包含与所述电极阵列间隔的单个电极,其中所述单个电极没有在所述第一转移位置上面延伸且没有与所述电极阵列呈双平面构型,其中通过使用共面电极使所述流体微滴移动至所述转移位置。

[0677] 条款124. 使用条款106-123中的任一项的装置的方法,或条款66-105中的任一项的方法,用于测量或检测存在于生物样品中的分析物或用于诊断患者或筛查血液供给。

[0678] 条款125. 条款1-45或66-105中的任一项的方法,其中至少步骤(a)-(d)使用条款106-123中的任一项的装置完成。

[0679] 条款126. 条款106-123中的任一项的装置的用途,或条款1-45中的任一项的方法的用途,在诊断患者或筛查血液供给的方法中或用于测量或检测存在于生物样品中的分析物。

[0680] 条款127. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含与其附接的可切割标签;(c)除去未结合至与所述第一结合成员结合的分析物的第二结合成员;(d)切割与第二结合成员附接的标签,所述第二结合成员结合至与所述第一结合成员结合的分析物;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0681] 条款128. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;(b)使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含适体;(c)除

去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体；(d) 解离与所述分析物结合的适体和 (e) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体；和 (f) 评估穿过所述层转移的适体，其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件，其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量：i) 计数在设定的时间段内转移事件的数目，并将所述转移事件的数目与对照关联；ii) 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联；或iii) 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联，其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准，其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i) 中的标准曲线；其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii) 中的标准曲线；且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii) 中的标准曲线。

[0682] 条款129. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法，所述方法包括：(a) 使所述样品与结合成员接触，其中所述结合成员被固定化在固体支持物上，且其中所述结合成员特异性地结合所述分析物；(b) 使所述样品与经标记的分析物接触，其中所述经标记的分析物用可切割标签标记；(c) 除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物；(d) 切割标签，所述标签附接到与所述结合成员结合的经标记的分析物；(e) 穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签；和 (f) 评估穿过所述层转移的标签，其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件，其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量：i) 计数在设定的时间段内转移事件的数目，并将所述转移事件的数目与对照关联；ii) 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联；或iii) 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联，其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准，其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i) 中的标准曲线；其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii) 中的标准曲线；且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii) 中的标准曲线。

[0683] 条款130. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法，所述方法包括：(a) 使所述样品与结合成员接触，其中结合成员被固定化在固体支持物上，且其中结合成员特异性地结合所述分析物；(b) 使所述样品与经标记的分析物接触，其中所述经标记的分析物包含适体；(c) 除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物；(d) 解离结合至所述经标记的分析物的适体，并穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体；和 (e) 评估穿过所述层转移的适体，其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件，其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量，其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量：i) 计数在设定的时间段内转移事件的数目，并将所述转移事件的数目与对照关联；ii) 测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联；或iii) 测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联，其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准，其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i) 中的标准曲线；其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii) 中的标准曲线；且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii) 中的标准曲线。

[0684] 条款131. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员用可切割标签标记;(b)使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c)除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d)切割标签,所述标签附接到与所述固定化的分析物结合的结合成员;(e)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(f)评估穿过所述层转移的标签,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0685] 条款132. 一种用于测量存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员包含适体;(b)使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c)除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d)解离适体,所述适体结合至与所述固定化的分析物结合的结合成员,和穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e)评估穿过所述层转移的适体,其中穿过所述层转移的每个适体是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参比标准,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0686] 条款133. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员被固定化在固体支持物上,所述结合成员包含与其附接的可切割标签,且所述结合成员特异性地结合所述分析物;(b)除去未结合至所述分析物的结合成员;(c)切割标签,所述标签附接到与所述分析物结合的结合成员;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中穿过所述层转移的每个标签是转移事件,其中测量转移事件的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,其中如下确定存在于所述样品中的分析物的量:i)计数在设定的时间段内转移事件的数目,并将所述转移事件的数目与对照关联;ii)测量发生设定数目的转移事件的时间量并与对照关联;或iii)测量发生转移事件之间的平均时间并与对照关联,其中所述对照是包含校正曲线、标准添加或数字聚合酶链式反应的参照。

[0687] 条款134. 条款133的方法,其中通过针对设定的时间段内分析物的对照浓度测量

转移事件的数目来确定分项i)中的标准曲线;其中通过针对分析物的对照浓度测量发生设定数目的转移事件所需的时间来确定分项ii)中的标准曲线;且其中通过针对分析物的对照浓度测量发生转移事件之间的平均时间来确定分项iii)中的标准曲线。

[0688] 条款135. 一种集成的数字微流体纳米孔实现装置,其包含:微流体模块和纳米孔实现模块;所述微流体模块包含与单个电极间隔的电极阵列,所述单个电极的大小设置成与所述电极阵列的至少一部分重叠,其中所述电极阵列和所述单个电极将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的转移电极,其中所述转移电极定位在所述微流体模块和所述纳米孔实现模块之间的接口处;所述纳米孔实现模块包含:定位在第一基底的第一表面上的第一微通道;定位在第二基底的第一表面上的第二微通道;其中所述第一基底的第一表面与所述第二基底的第一表面发生接触,由此封闭所述第一微通道和所述第二微通道以分别提供第一毛细管通道和第二毛细管通道,其中至少所述第一毛细管通道延伸至所述微流体模块和所述纳米孔实现模块之间的接口且邻近所述转移电极,并且定位成接收定位在所述转移电极上的流体微滴;其中所述第一毛细管通道与所述第二毛细管通道相交,其中一个层定位在所述第一基底和第二基底之间所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道发生相交的位置,其中所述层缺乏纳米孔且分离存在于所述第一毛细管通道和第二毛细管通道中的离子液体,其中所述第一毛细管通道和第二毛细管通道与用于驱动从所述第一毛细管通道至所述第二毛细管通道(或反之亦然)的电压的电极发生电连接以在所述层中在所述第一毛细管通道和第二毛细管通道的相交处建立纳米孔。

[0689] 条款136. 条款135的装置,其中所述离子液体是水溶液。

[0690] 条款137. 条款136的装置,其中所述水溶液是盐溶液。

[0691] 条款138. 条款135-137中的任一项的装置,其中所述离子液体包含目标分析物,其中所述装置被构造成检测所述分析物在所述离子液体中的存在或不存在。

[0692] 条款139. 一种用于在集成的数字微流体纳米孔实现装置中产生纳米孔的方法,所述方法包括:提供条款135-138中的任一项的集成的数字微流体纳米孔实现装置;在所述第一毛细管通道和第二毛细管通道中施加电压以驱动电流穿过所述层;测量跨所述层的电导;在检测到指示纳米孔在所述层中产生的电导后,终止电压的施加。

[0693] 条款140. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;在所述第一基底或第二基底中的开口,所述开口与包含纳米孔的纳米孔层流体连通;和一对电极,所述电极被构造成穿过所述纳米孔施加电场,其中所述电极阵列被构造成将流体的至少一个微滴运输至所述开口。

[0694] 条款141. 条款140的装置,其中所述开口是毛细管通道。

[0695] 条款142. 条款141的装置,其中所述毛细管通道具有在所述第一基底或第二基底的第一侧面上的开口,所述开口宽于在所述第一基底或第二基底的第二侧面上的开口。

[0696] 条款143. 条款142的装置,其中所述检测电极对包含是单个电极的第一检测电极。

[0697] 条款144. 条款142或143的装置,其中所述检测电极对包含设置在所述第二侧面上的第二检测电极。

[0698] 条款145. 一对集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:

根据条款142的第一个集成的数字微流体纳米孔装置,其中所述单个电极是第一单个

电极,且所述毛细管通道是第一毛细管通道;和第二个集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第三基底,其包含第五侧面和与所述第五侧面相对的第六侧面,其中所述第五侧面包含电极阵列;与所述第三基底间隔的第四基底,其中所述第四基底包含面向所述第三基底的第五侧面的第七侧面和与所述第七侧面相对的第八侧面,其中所述第七侧面包含第二单个电极,且其中所述纳米孔层设置在所述第八侧面上,其中所述第四基底包含从所述第四基底的第七侧面延伸至第八侧面的第二毛细管通道,其中所述纳米孔层定位在所述毛细管通道的开口上面,其中所述纳米孔层介于所述第二基底和所述第四基底之间,使得所述纳米孔提供在所述第一毛细管通道和所述第二毛细管通道之间的电渗导管,其中所述检测电极对包含第二检测电极,其为所述第二单个电极。

[0699] 条款146. 一种集成的数字微流体纳米孔实现装置,其包含:第一基底,其包含第一侧面和与所述第一侧面相对的第二侧面,其中所述第一侧面包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底,其中所述第二基底包含面向所述第一基底的第一侧面的第三侧面和与所述第三侧面相对的第四侧面;纳米孔实现层,其缺乏纳米孔且设置在所述装置的外侧面上,其中所述外侧面选自所述第二侧面或所述第四侧面,其中包含所述外侧面的第一基底或第二基底之一包含毛细管通道,所述毛细管通道从所述第一基底的第一侧面延伸至第二侧面或者从所述第二基底的第三侧面延伸至第四侧面,其中所述纳米孔实现层定位在所述毛细管通道的开口上面;和一对电极,所述电极被构造成跨所述纳米孔实现层施加电场,其中所述电极阵列被构造成将流体的至少一个微滴运输至所述毛细管通道。

[0700] 条款147. 一种用于在集成的数字微流体纳米孔实现装置中产生纳米孔的方法,所述方法包括:提供条款143的集成的数字微流体纳米孔实现装置;将所述纳米孔实现层的两个侧面浸入离子液体中,使得在所述层的每个侧面上的离子液体与所述检测电极对的任一个发生电接触;在所述检测电极对之间施加电压以驱动电流穿过所述层;测量跨所述层的电导;在检测到指示纳米孔在所述层中产生的电导后,终止电压的施加。

[0701] 条款148. 条款147的方法,其中所述离子液体是盐溶液。

[0702] 条款149. 条款147或148的方法,其中所述离子液体包含目标分析物,其中所述装置被构造成检测所述分析物在所述离子液体中的存在或不存在。

[0703] 条款150. 条款139或147-149中的任一项的方法,所述方法还包括调节产生的纳米孔。

[0704] 条款151. 条款150的方法,其中所述调节包括:跨所述纳米孔膜交替地施加具有第一极性的第一电压和具有与所述第一极性相反的第二极性的第二电压,其中所述第一电压和第二电压各自施加至少一次;和测量与所述纳米孔的大小有关的电渗性质。

[0705] 条款152. 条款150或151的方法,所述方法还包括在所述调节之前测量与所述纳米孔的大小有关的电渗性质。

[0706] 条款153. 一种组合物,其包含结合成员、标签和间隔物。

[0707] 条款154. 条款153的组合物,其中所述间隔物包含硝基苄基、二硫代乙基氨基、6碳间隔物、12碳间隔物、或3-(9-((3-羧基丙基)(甲磺酰基)氨基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐。

[0708] 条款155. 条款154的组合物,其中所述间隔物包含硝基苄基,且所述标签是DNA分子。

[0709] 条款156. 条款154的组合物,其中所述间隔物是二硫代乙基氨基,且所述标签是羧基化的纳米颗粒。

[0710] 条款157. 条款154的组合物,其中所述间隔物是3-(9-((3-羧基丙基)(甲苯磺酰基)氨甲酰基)吡啶-10-鎓-10-基)丙烷-1-磺酸盐,且所述标签是寡核苷酸。

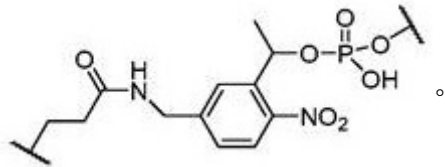
[0711] 条款158. 条款154的组合物,其中所述间隔物包含6碳间隔物或12碳间隔物,且所述标签是生物素。

[0712] 条款159. 条款158的组合物,其中所述第二结合成员包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO: 1-11中的任一个所示的核苷酸序列。

[0713] 条款160. 条款153-159中的任一项的组合物,其中所述标签包含可切割的接头。

[0714] 条款161. 条款160的组合物,其中所述可切割的接头选自光可切割的接头、化学可切割的接头、热可切割的接头、热敏感的可切割的接头和酶可切割的接头。

[0715] 条款162. 条款161的组合物,其中所述可切割的接头是光可切割的接头,其中所述光可切割的接头包含源自以下的光可切割的部分



[0716] 条款163. 条款161的组合物,其中所述可切割的接头是热可切割的接头且使用局部温度升高来切割。

[0717] 条款164. 条款163的组合物,其中所述局部温度升高光热地或通过微波辐射产生。

[0718] 条款165. 条款164的组合物,其中将来自光的能量转移至吸收靶标。

[0719] 条款166. 条款165的组合物,其中所述吸收靶标包含染料、颜料或水。

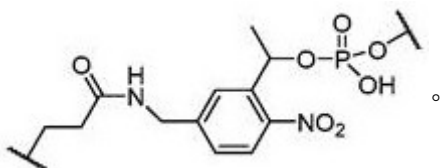
[0720] 条款167. 条款163-166中的任一项的组合物,其中所述可切割的接头包含双链DNA。

[0721] 条款168. 条款161的组合物,其中所述可切割的接头是化学可切割的接头和切割由巯基介导。

[0722] 条款169. 条款29、66、68、70、72-86、92-94、98-105、127、129、131、133和134中的任一项的方法,其中所述标签包含可切割的接头。

[0723] 条款170. 条款169的方法,其中所述可切割的接头选自光可切割的接头、化学可切割的接头、热可切割的接头、热敏感的可切割的接头和酶可切割的接头。

[0724] 条款171. 条款170的方法,其中所述可切割的接头是光可切割的接头,且所述光可切割的接头包含源自以下的光可切割的部分



[0725] 条款172. 条款170的方法,其中所述可切割的接头是热可切割的接头且使用局部温度升高来切割。

- [0726] 条款173. 条款172的方法,其中所述局部温度升高光热地或通过微波辐射产生。
- [0727] 条款174. 条款173的方法,其中将来自光的能量转移至吸收靶标。
- [0728] 条款175. 条款174的方法,其中所述吸收靶标包含染料、颜料或水。
- [0729] 条款176. 条款172-175中的任一项的方法,其中所述可切割的接头包含双链DNA。
- [0730] 条款177. 条款30和170的方法,其中所述可切割的接头是化学可切割的接头且由巯基切割。
- [0731] 条款178. 条款2-30、31-45、64、70-105、125、127-134和169-177中的任一项的方法,其中一个或多个转移事件对应于结合成员与分析物的结合事件。
- [0732] 条款179. 条款178的方法,其中一个转移事件对应于结合成员与分析物的结合事件。
- [0733] 条款180. 条款178的方法,其中两个或更多个转移事件对应于结合成员与分析物的结合事件。
- [0734] 条款181. 条款180的方法,其中每个结合成员掺入两种或更多种标签,且两个或更多个转移事件代表所述结合成员与所述分析物的结合。
- [0735] 条款182. 条款1-45、63-105、124、125、127-134和169-181中的任一项的方法,其中至少两个或更多个纳米孔是在所述层中。
- [0736] 条款183. 条款182的方法,其中所述至少两个或更多个纳米孔并联或串联存在。
- [0737] 条款184. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;和纳米孔层,其具有设置在所述第一基底和第二基底之间的第一表面和第二表面,其中所述电极阵列被构造成将第一微滴定位在所述纳米孔层的第一表面处,其中所述电极阵列的至少两个电极定位成横过所述纳米孔层,其中所述两个电极形成阳极和阴极,并在液体微滴是在所述纳米孔层的第一表面处时运行以驱动电流穿过所述纳米孔层中的纳米孔。
- [0738] 条款185. 条款173的电极阵列,其进一步被构造成将第二微滴定位在所述纳米孔层的第二表面。
- [0739] 条款186. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含微流体模块和纳米孔模块;所述微流体模块包含电极阵列,其中所述电极阵列将流体的至少一个微滴运输至所述电极阵列中的转移位置,其中所述转移位置是在所述微流体模块和所述纳米孔模块之间的接口处;所述纳米孔模块包含:从所述转移位置延伸至纳米孔层的第一毛细管通道。
- [0740] 条款187. 一种集成的数字微流体纳米孔装置,其包含:第一基底,其包含电极阵列;与所述第一基底间隔的第二基底;在其中具有一个或多个纳米孔的第一纳米孔层;在其中具有一个或多个纳米孔的第二纳米孔层;和至少两个电极,其用于建立电场以驱动标签穿过所述第一纳米孔层和第二纳米孔层中的纳米孔。
- [0741] 条款188. 条款30的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。
- [0742] 条款189. 条款188的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌素。
- [0743] 条款190. 条款188的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。
- [0744] 条款191. 条款30和188-190中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述第一

结合成员和第二结合成员依次或同时加入所述样品中。

[0745] 条款192. 条款1-45、63-105、124、125、127-134、169-181、183和188-191中的任一项的方法,其中所述孔与所述标签的大小比率是或小于1.0。

[0746] 条款193. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和用可切割标签标记的经标记的分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述结合成员特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/结合成员/目标分析物复合物或固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物;(b)除去未结合至所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员的经标记的分析物;(c)切割标签,所述标签附接到与所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员结合的经标记的分析物;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0747] 条款194. 条款193的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。

[0748] 条款195. 条款194的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌素。

[0749] 条款196. 条款194的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。

[0750] 条款197. 条款193-196中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述结合成员和所述经标记的分析物依次或同时加入所述样品中。

[0751] 条款198. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和外源分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述外源分析物包含所述固定化试剂的配体且结合所述固体支持物从而形成固体支持物/固定化的分析物复合物,且所述结合成员包含可切割标签且特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/目标分析物/结合成员复合物或固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物;(b)除去未结合在所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物或所述固体支持物/目标分析物/结合成员复合物中的结合成员;(c)切割标签,所述标签附接到所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物中的结合成员;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0752] 条款199. 条款198的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。

[0753] 条款200. 条款199的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌素。

[0754] 条款201. 条款199的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。

[0755] 条款202. 条款198-201中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述结合成员和外源分析物依次或同时加入所述样品中。

[0756] 条款203. 条款198-201中的任一项的方法,其中在步骤(c)中切割所述标签之前,

分离所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物。

[0757] 条款204. 条款203的方法,其中可以使用磁场完成分离。

[0758] 条款205. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和用适体标记的经标记的分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述结合成员包含所述固定化试剂的配体,且所述结合成员特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/结合成员/目标分析物复合物或固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物;(b)除去未结合至所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员的经标记的分析物;(c)解离所述适体,所述适体附接到与所述固体支持物/结合成员/经标记的分析物复合物中的结合成员结合的经标记的分析物;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e)评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

[0759] 条款206. 条款205的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。

[0760] 条款207. 条款206的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌素。

[0761] 条款208. 条款206的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。

[0762] 条款209. 条款205-208中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述结合成员和所述经标记的分析物依次或同时加入所述样品中。

[0763] 条款210. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的目标分析物的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与固体支持物、结合成员和外源分析物接触,其中所述固体支持物包含固定化试剂,所述外源分析物包含所述固定化试剂的配体且结合所述固体支持物从而形成固体支持物/固定化的分析物复合物,且所述结合成员包含适体且特异性地结合所述目标分析物从而形成固体支持物/目标分析物/结合成员复合物或固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物;(b)除去未结合在所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物或所述固体支持物/目标分析物/结合成员复合物中的结合成员;(c)解离适体,所述适体结合至所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物中的结合成员;(d)穿过层中的一个或多个纳米孔转移所述标签;和(e)评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物。

[0764] 条款211. 条款210的方法,其中所述固定化试剂包含生物素或抗生蛋白链菌素。

[0765] 条款212. 条款211的方法,其中所述固定化试剂包含生物素,且配体包含抗生蛋白链菌素。

[0766] 条款213. 条款211的方法,其中所述固定化试剂包含抗生蛋白链菌素,且配体包含生物素。

[0767] 条款214. 条款210-213中的任一项的方法,其中所述固体支持物、所述结合成员和外源分析物依次或同时加入所述样品中。

[0768] 条款215. 条款210-213中的任一项的方法,其中在步骤(c)中解离所述适体之前,分离所述固体支持物/固定化的分析物/结合成员复合物。

[0769] 条款216. 条款215的方法,其中可以使用磁场完成分离。

[0770] 条款217. 一种用于测量或检测存在于生物样品中的分析物的方法,所述方法包括:

I. (a) 使所述样品与第一结合成员接触,其中所述第一结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述第一结合成员特异性地结合所述分析物;(b) 使所述分析物与第二结合成员接触,其中所述第二结合成员特异性地结合所述分析物,且其中所述第二结合成员包含适体;(c) 除去未结合至与所述固体基底结合的分析物的适体;(d) 解离与所述分析物结合的适体,并穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e) 评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物;

II. (a) 使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员被固定化在固体支持物上,且其中所述结合成员特异性地结合所述分析物;(b) 使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述经标记的分析物用可切割标签标记;(c) 除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;(d) 切割标签,所述标签附接到与所述结合成员结合的经标记的分析物;(e) 穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述被切割的标签;和(f) 评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或其中检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物;

III. (a) 使所述样品与结合成员接触,其中结合成员被固定化在固体支持物上,且其中结合成员特异性地结合所述分析物;(b) 使所述样品与经标记的分析物接触,其中所述经标记的分析物包含适体;(c) 除去未结合至所述结合成员的经标记的分析物;(d) 解离适体,所述适体结合至与所述结合成员结合的经标记的分析物,并穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e) 评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物;

IV. (a) 使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员用可切割标签标记;(b) 使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c) 除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d) 切割标签,所述标签附接到与所述固定化的分析物结合的结合成员;(e) 穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述被切割的标签;和(f) 评估穿过所述层转移的标签,其中测量穿过所述层转移的标签的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的标签会检测存在于所述样品中的分析物;和

V. (a) 使所述样品与结合成员接触,其中所述结合成员特异性地结合所述分析物,且所述结合成员包含适体;(b) 使所述样品与固定化的分析物接触,其中所述固定化的分析物被固定化在固体支持物上;(c) 除去未结合至所述固定化的分析物的结合成员;(d) 解离适体,所述适体结合至与所述固定化的分析物结合的结合成员,并穿过或横过层中的一个或多个纳米孔转移所述解离的适体;和(e) 评估穿过所述层转移的适体,其中测量穿过所述层转移的适体的数目会测量存在于所述样品中的分析物的量,或检测穿过所述层转移的适体会检测存在于所述样品中的分析物。

[0771] 条款218. 条款193-217中的任一项的方法,其中所述孔与所述标签的大小比率是

或小于1.0。

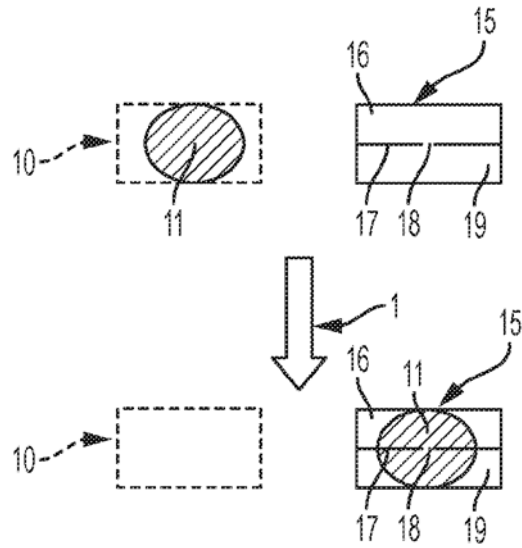


图 1A

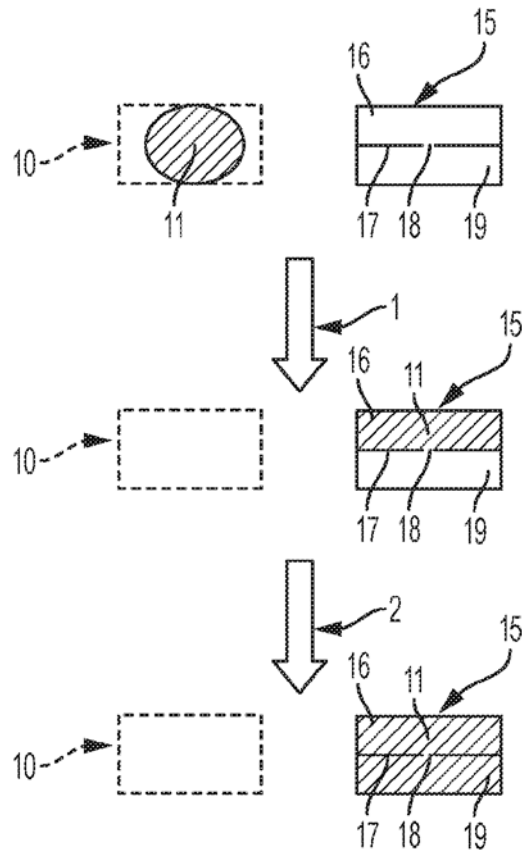


图 1B

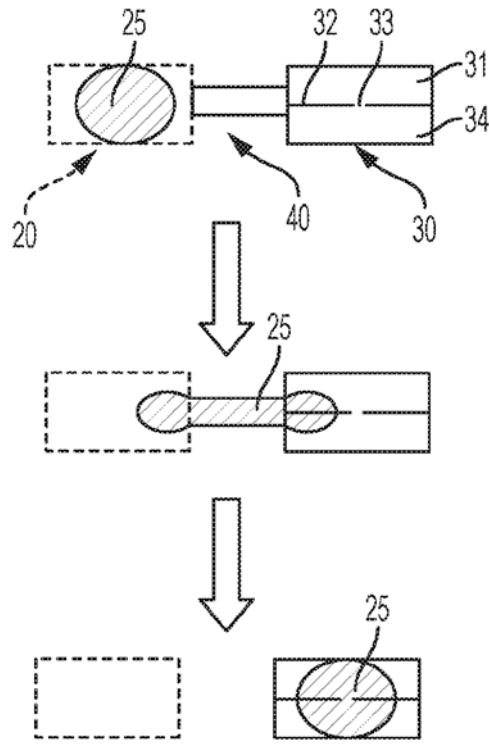


图 2A

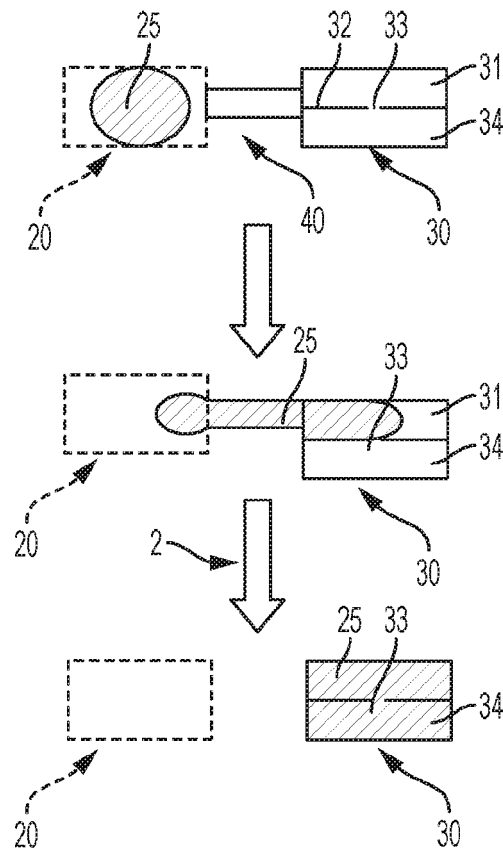


图 2B

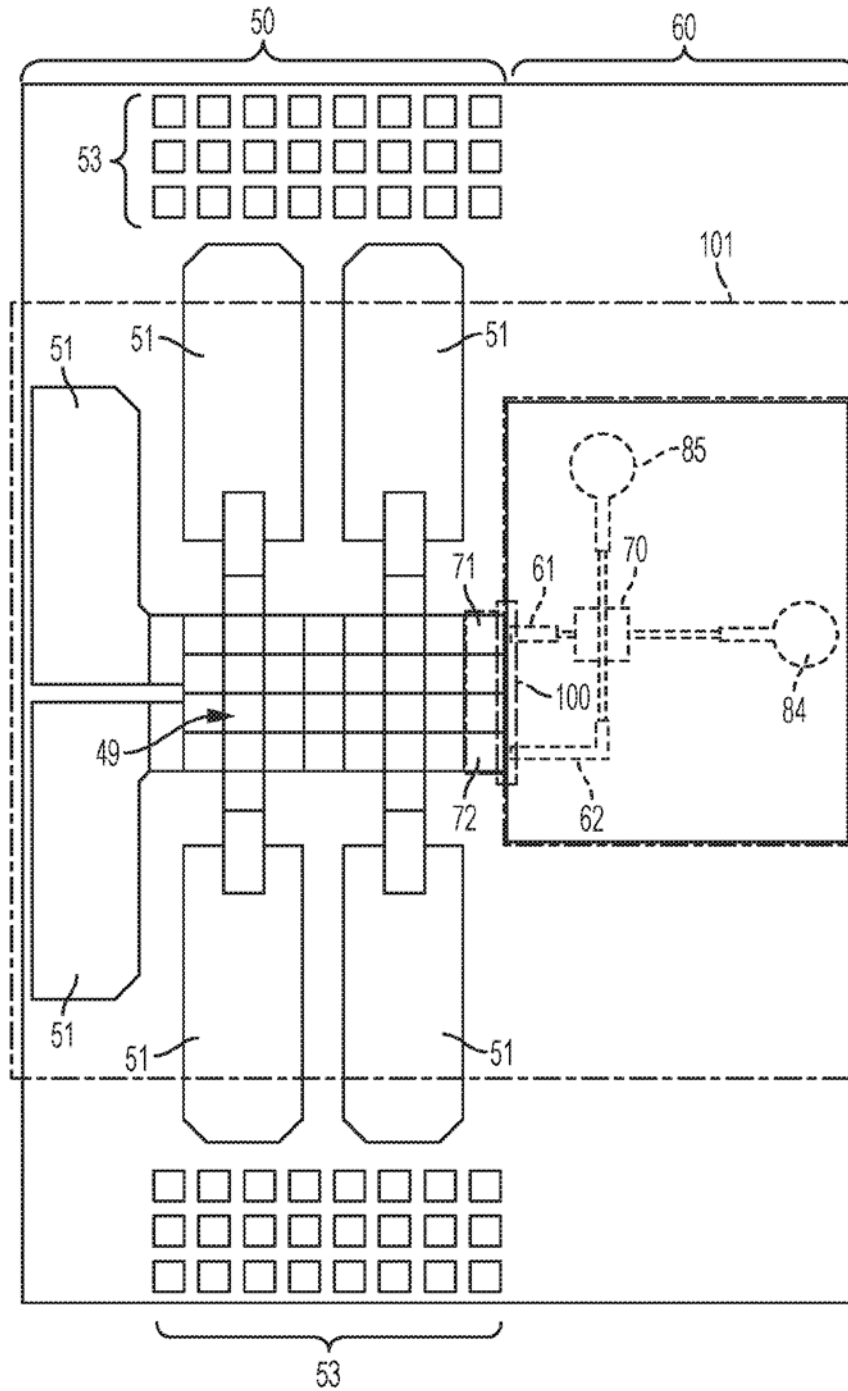


图 2C

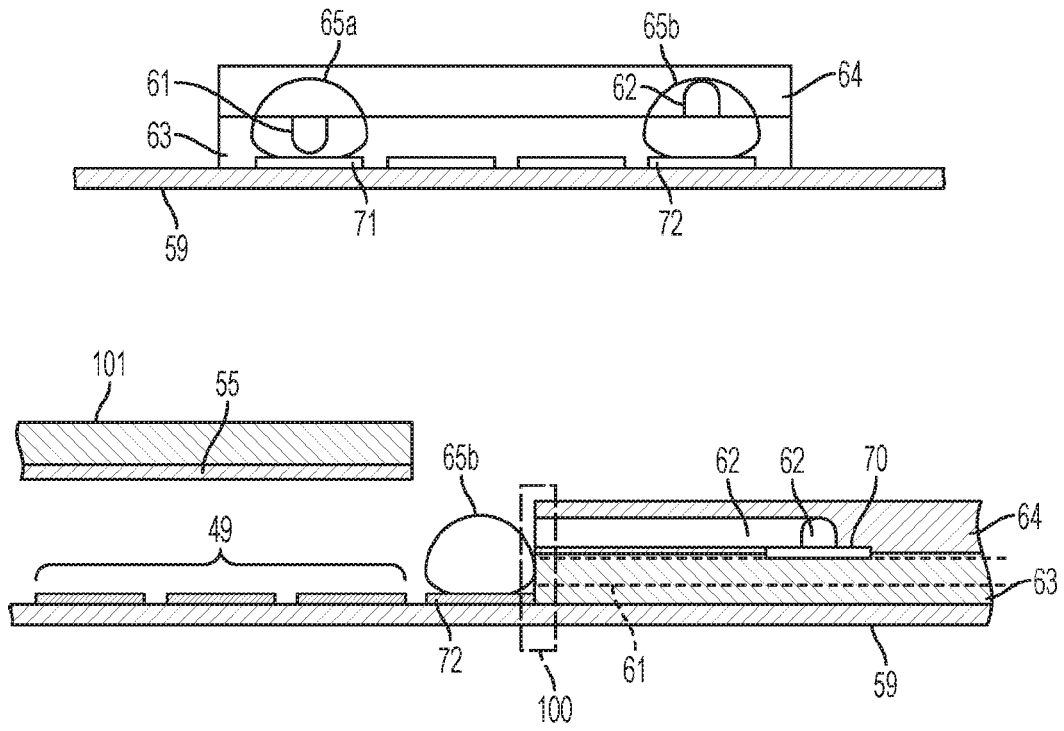


图 2D

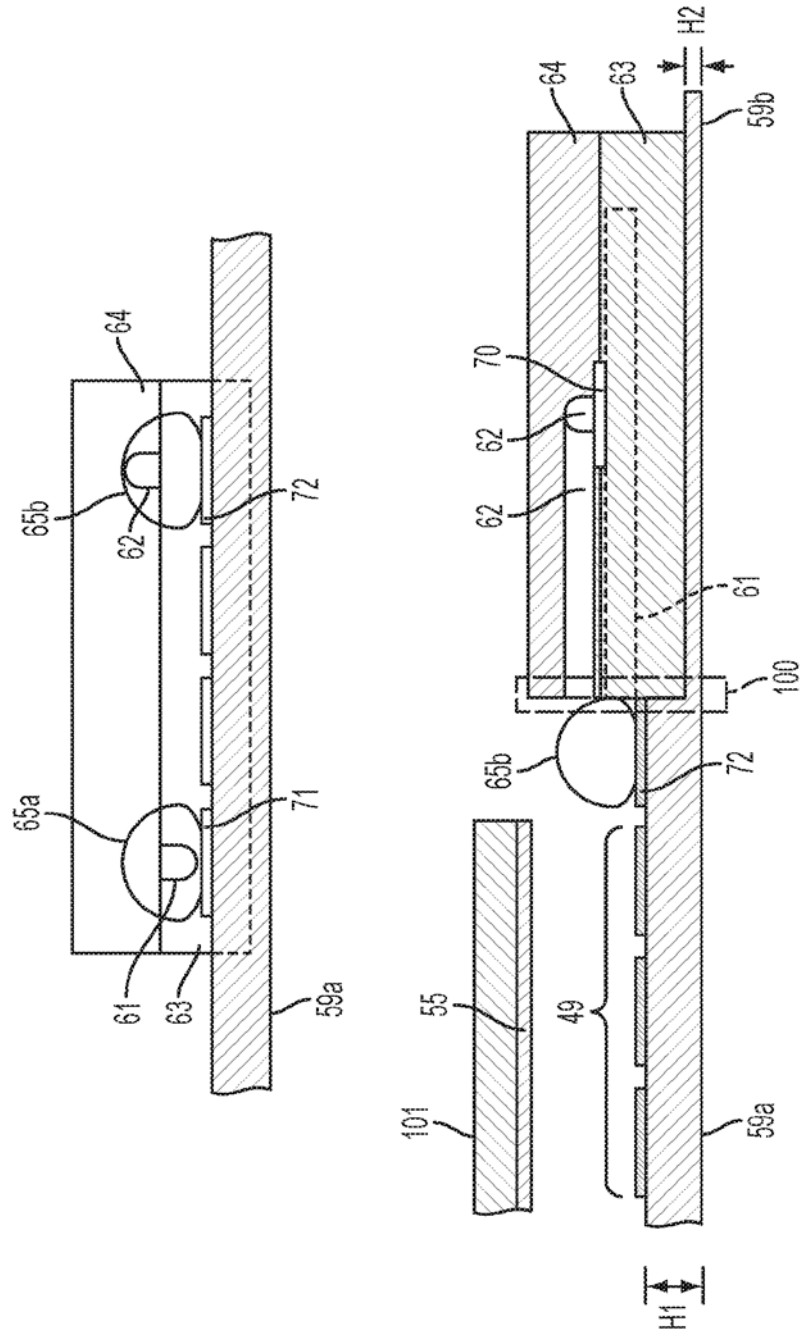


图 2E

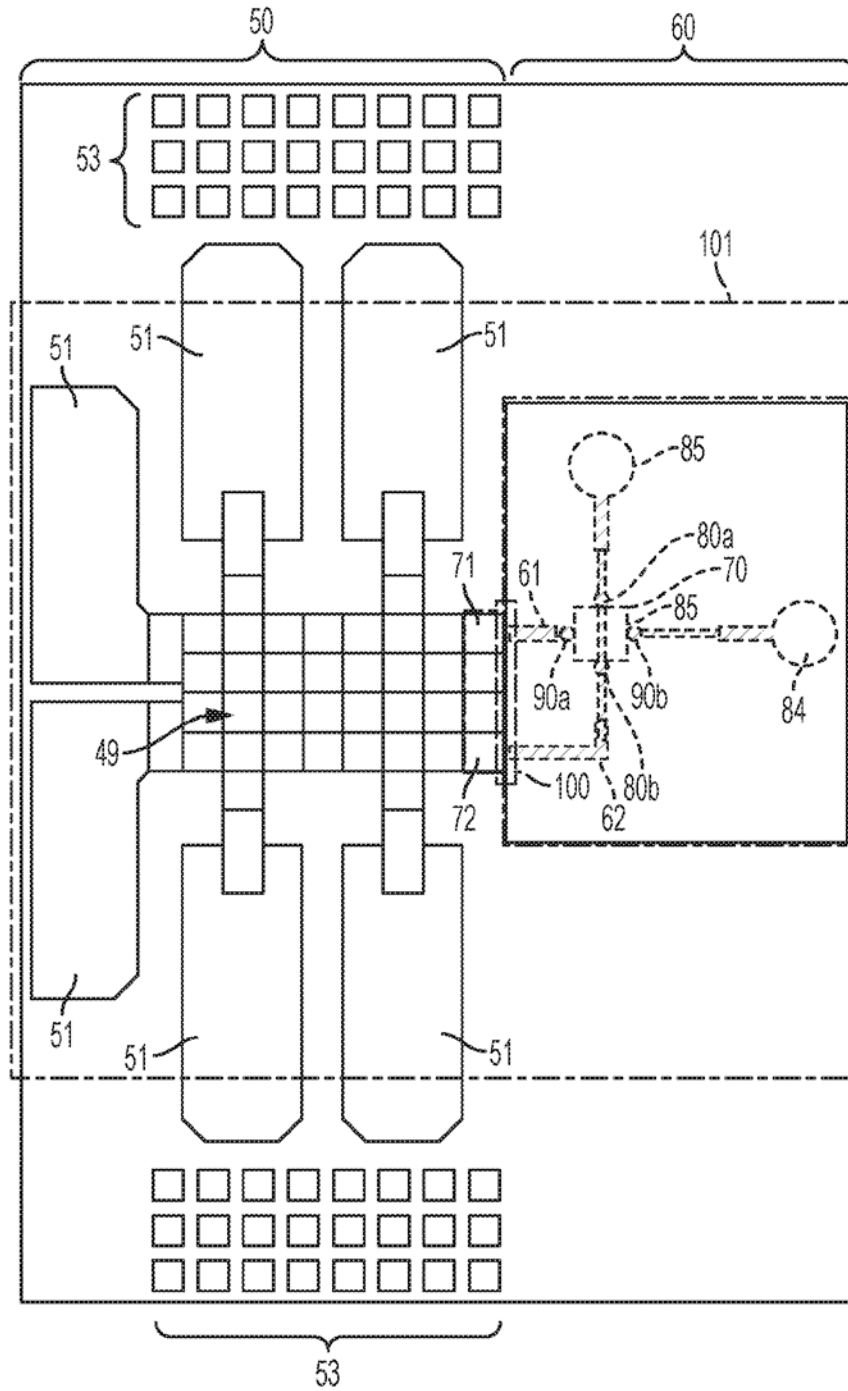


图 2F

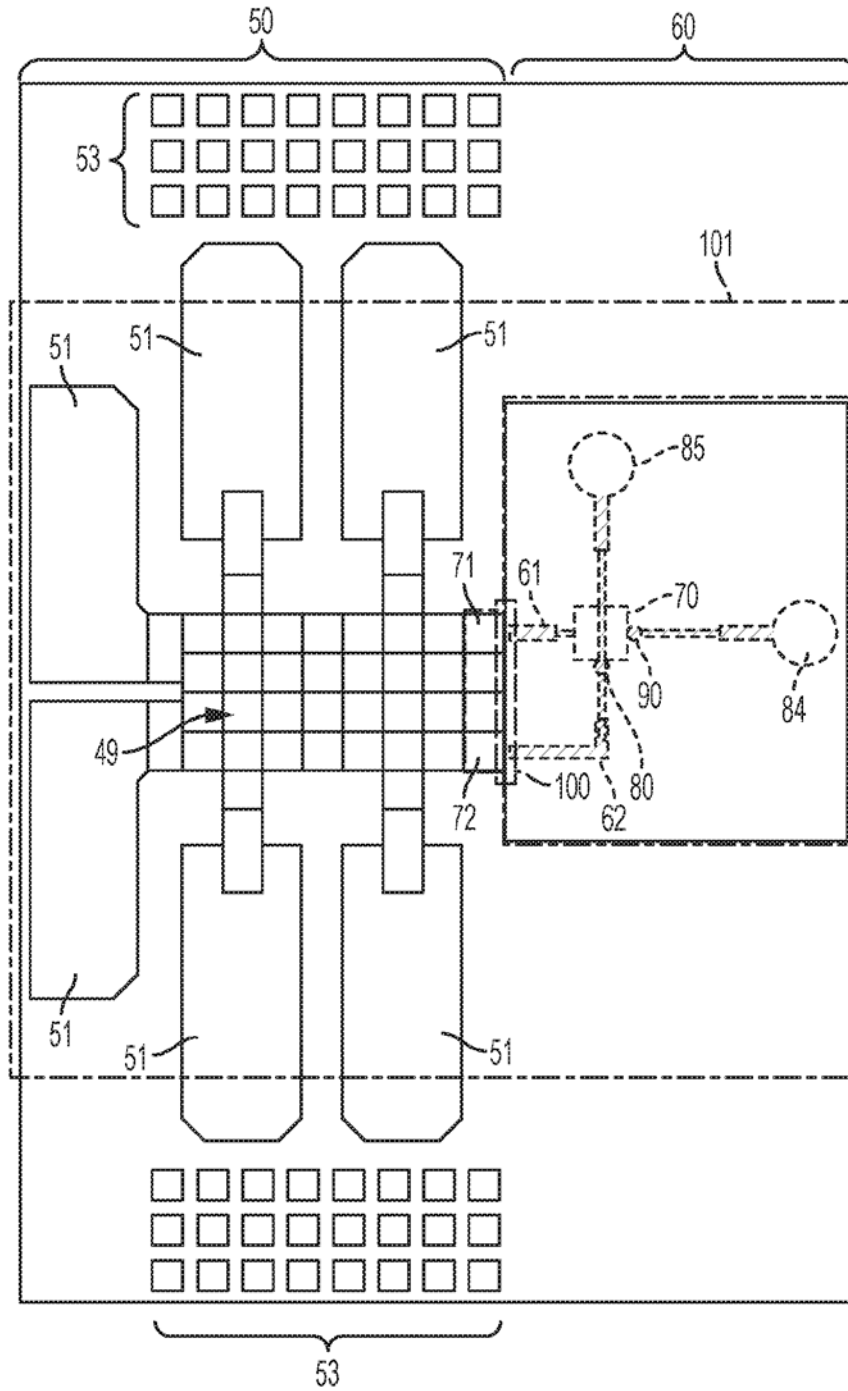


图 2G

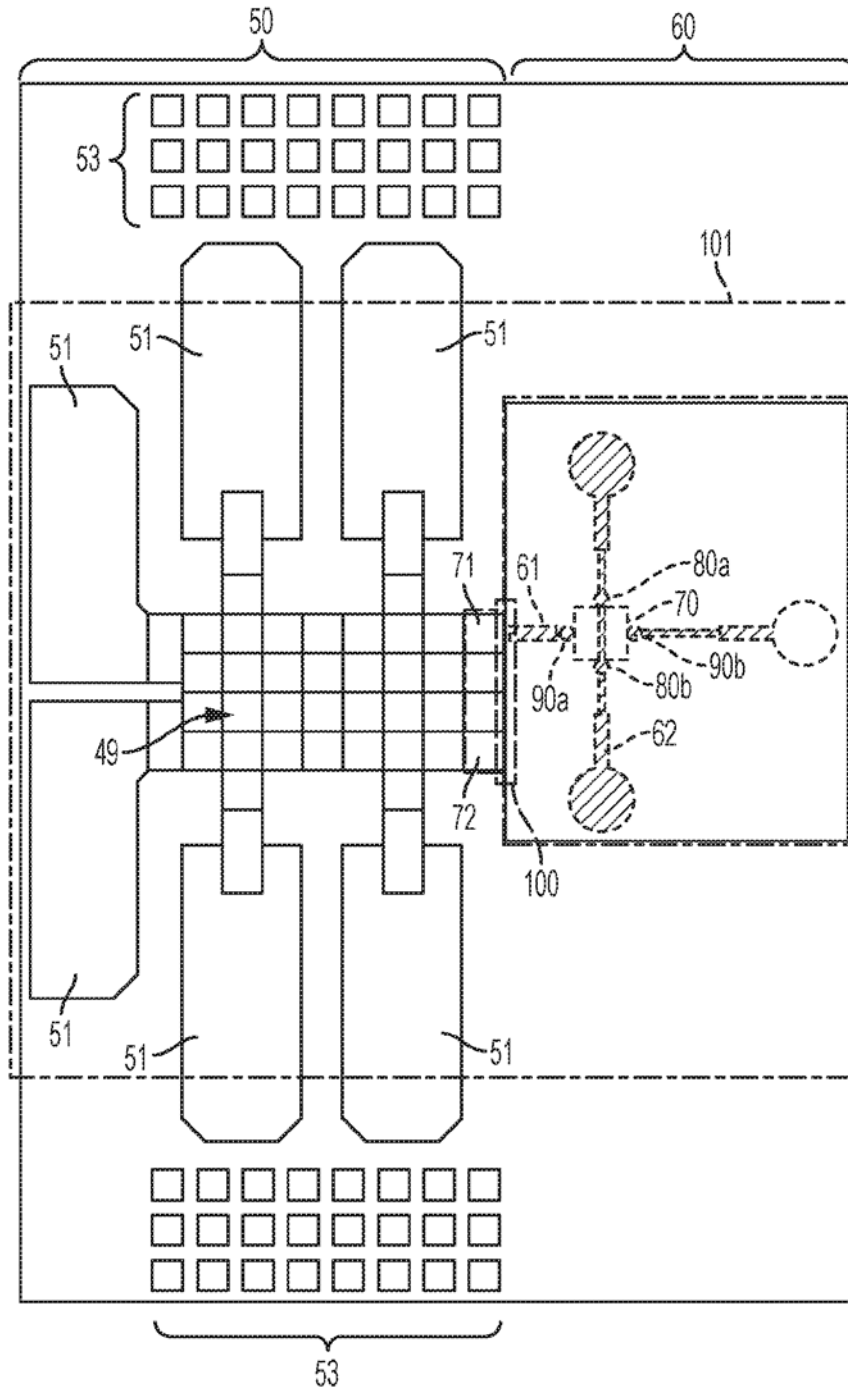


图 2H

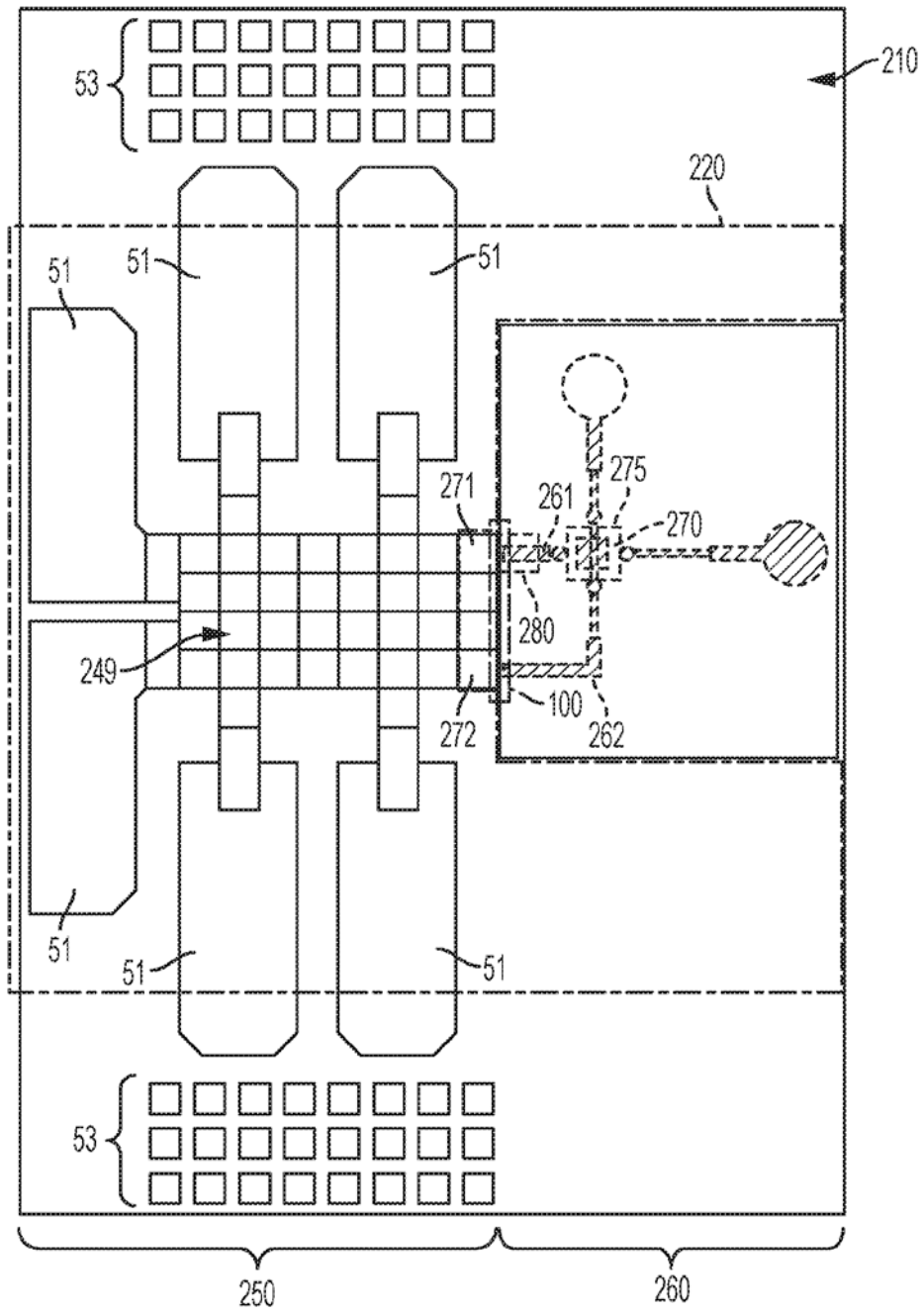


图 21

转移接口的横截面的前视图

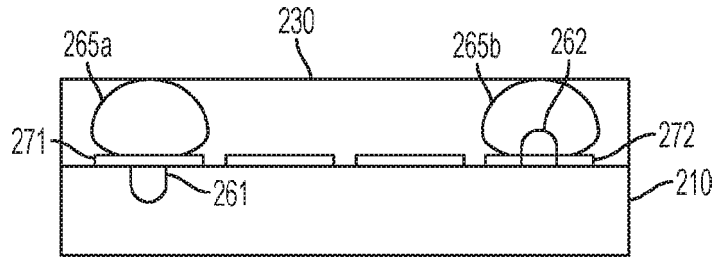


图 2I (续)

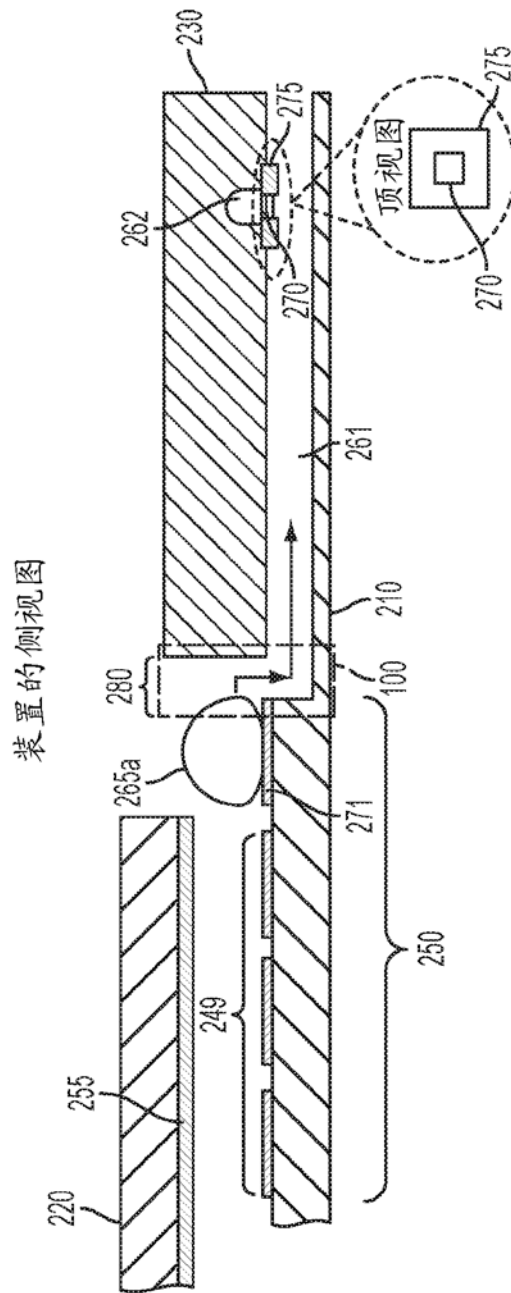


图 2J

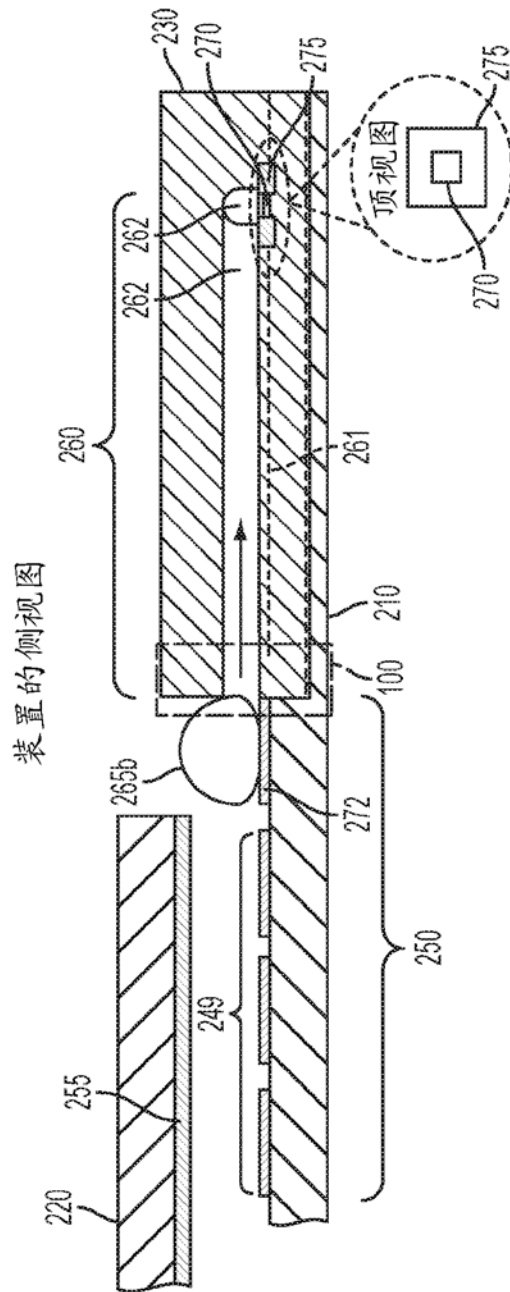


图 2K

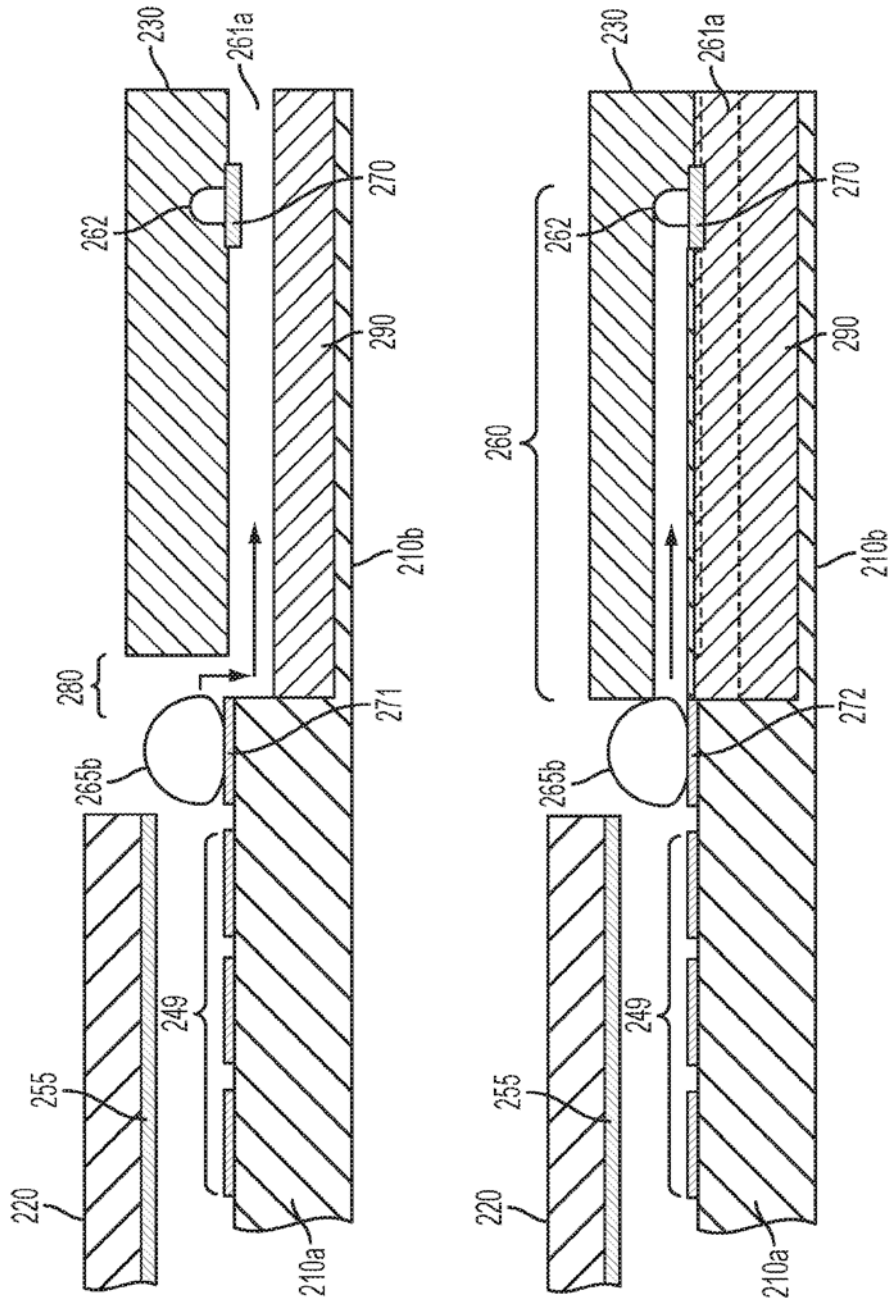


图 2L

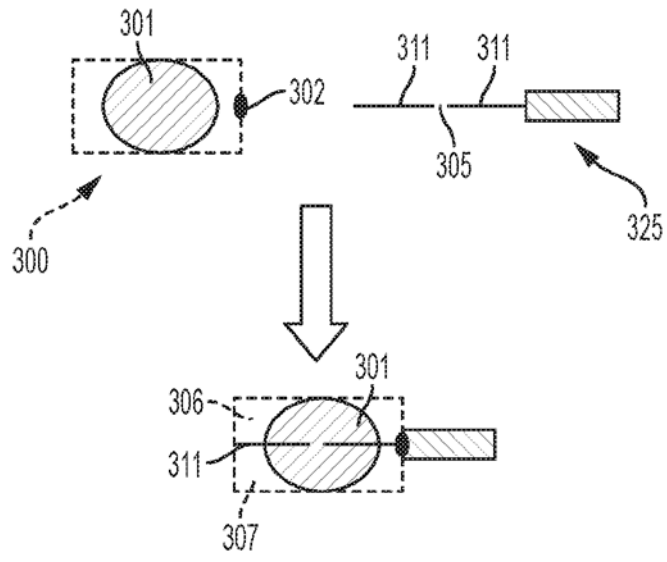


图 3

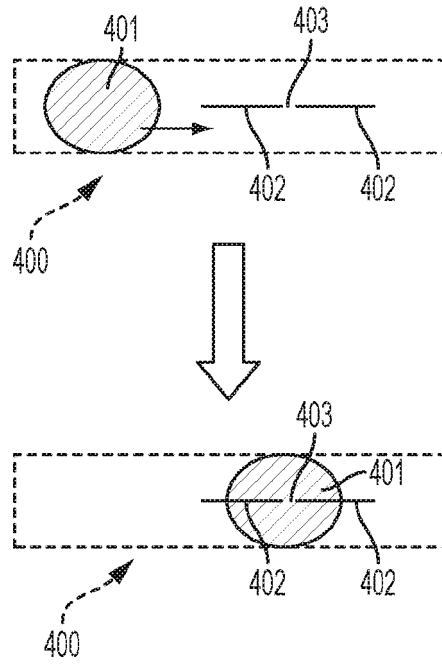


图 4

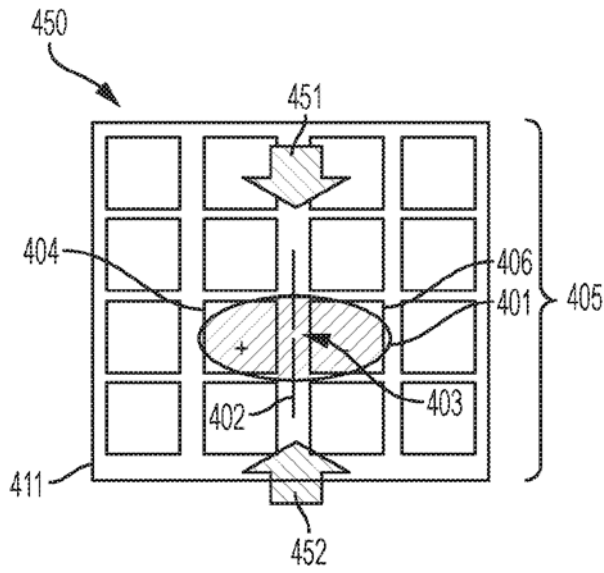


图 5A

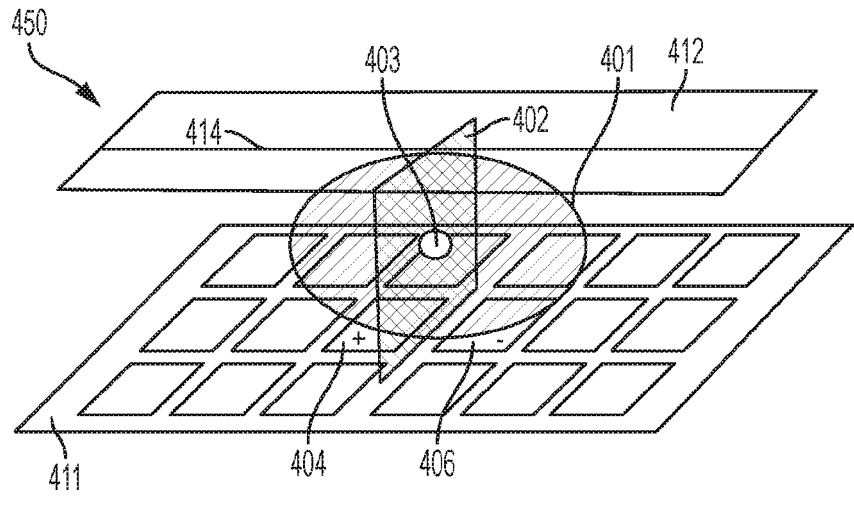


图 5B

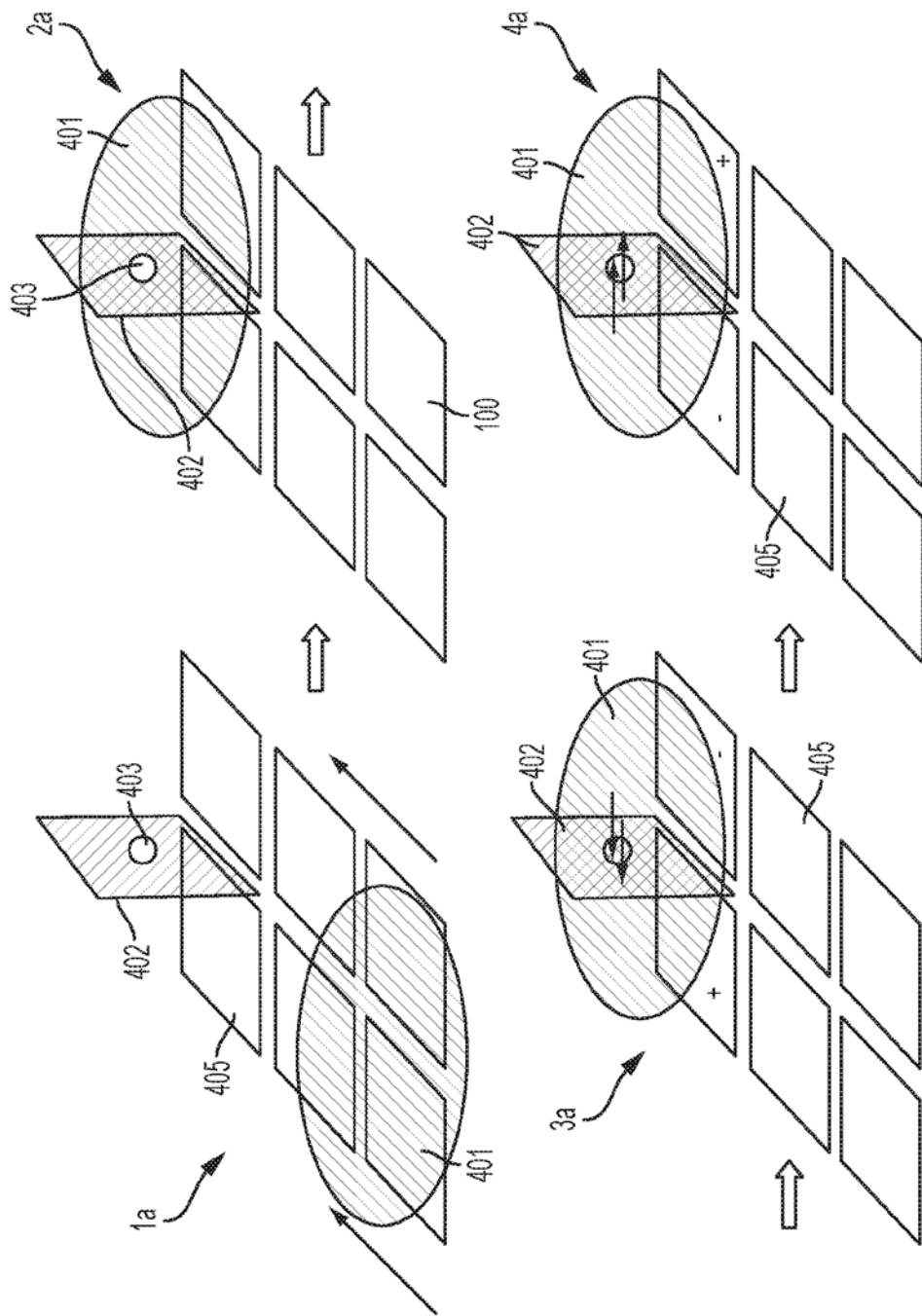


图 6

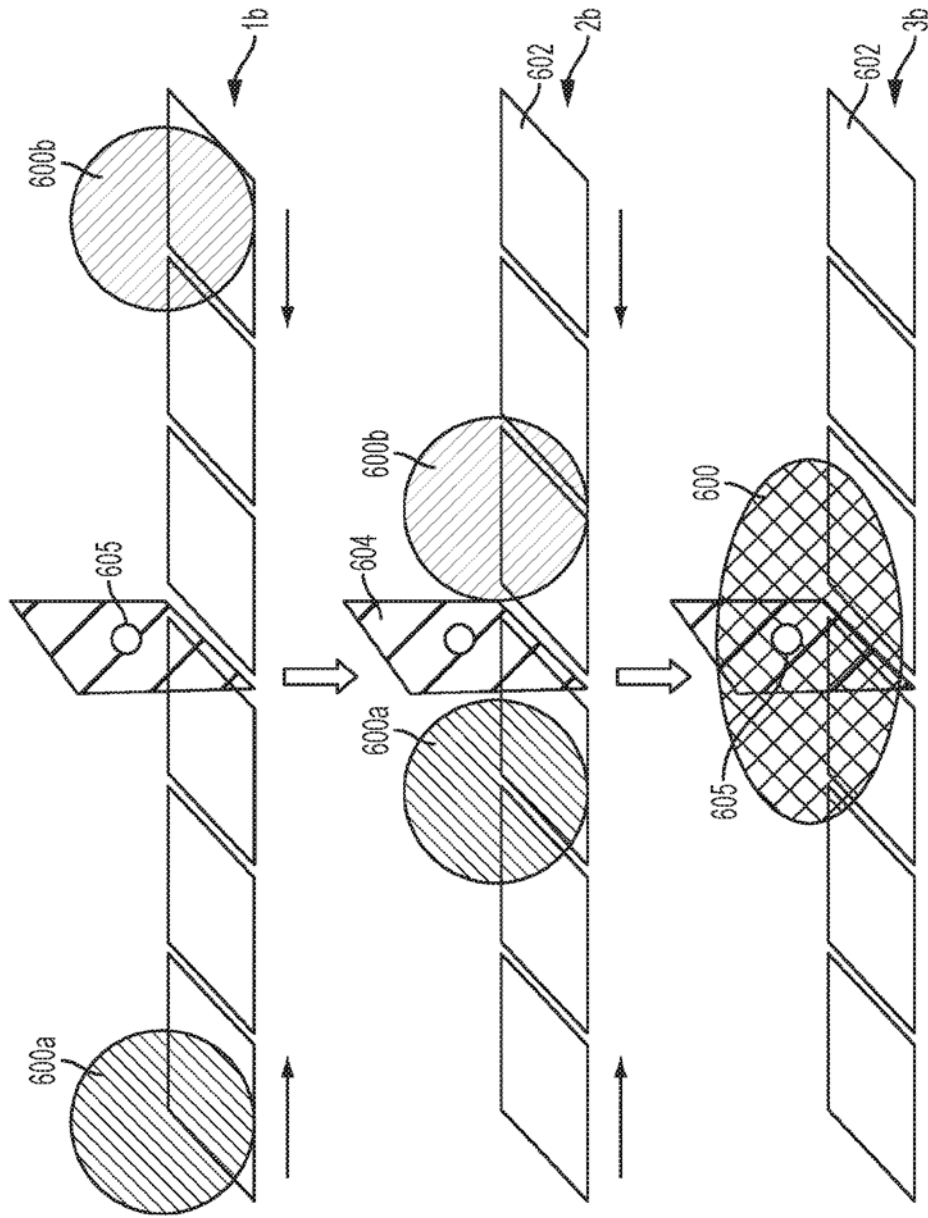


图 7

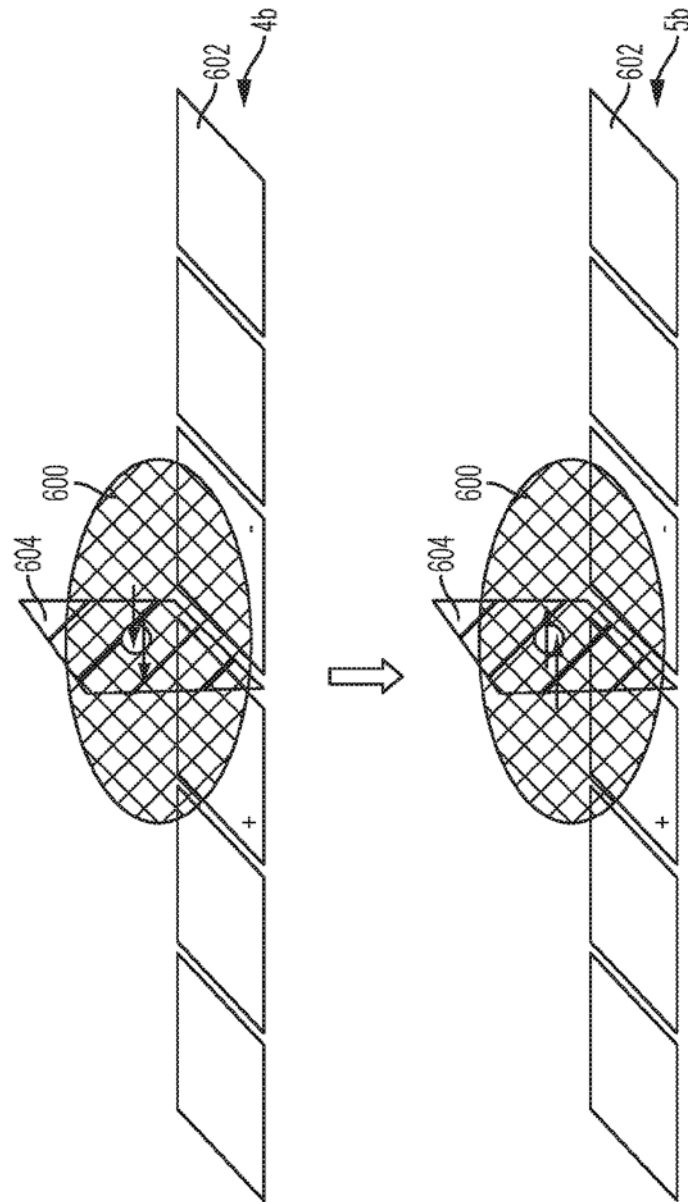


图 7B续

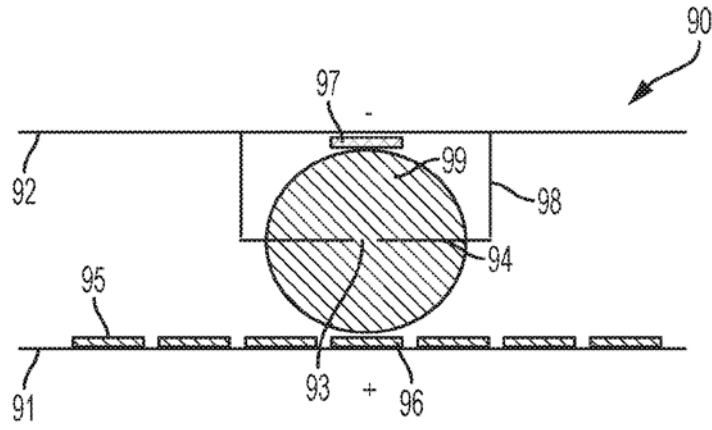


图 8

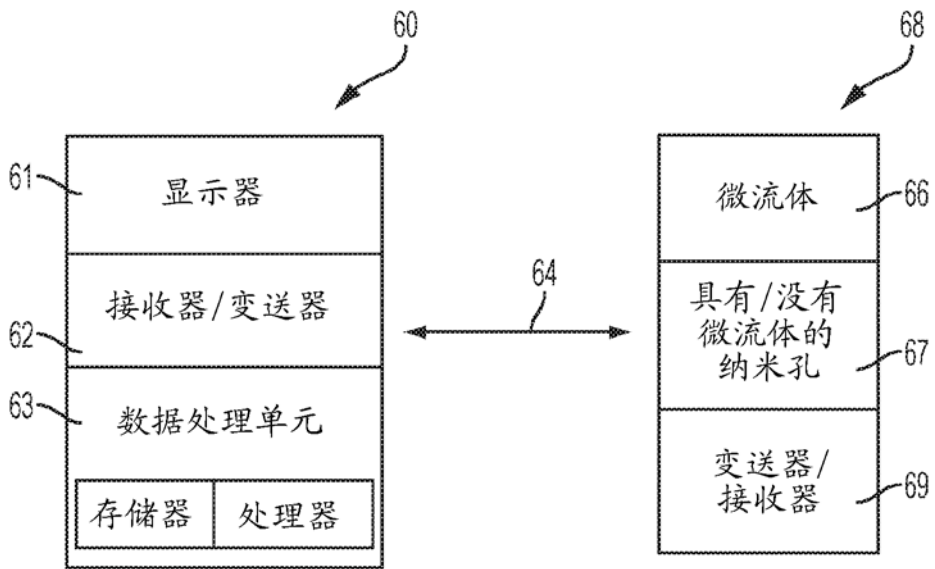


图 9

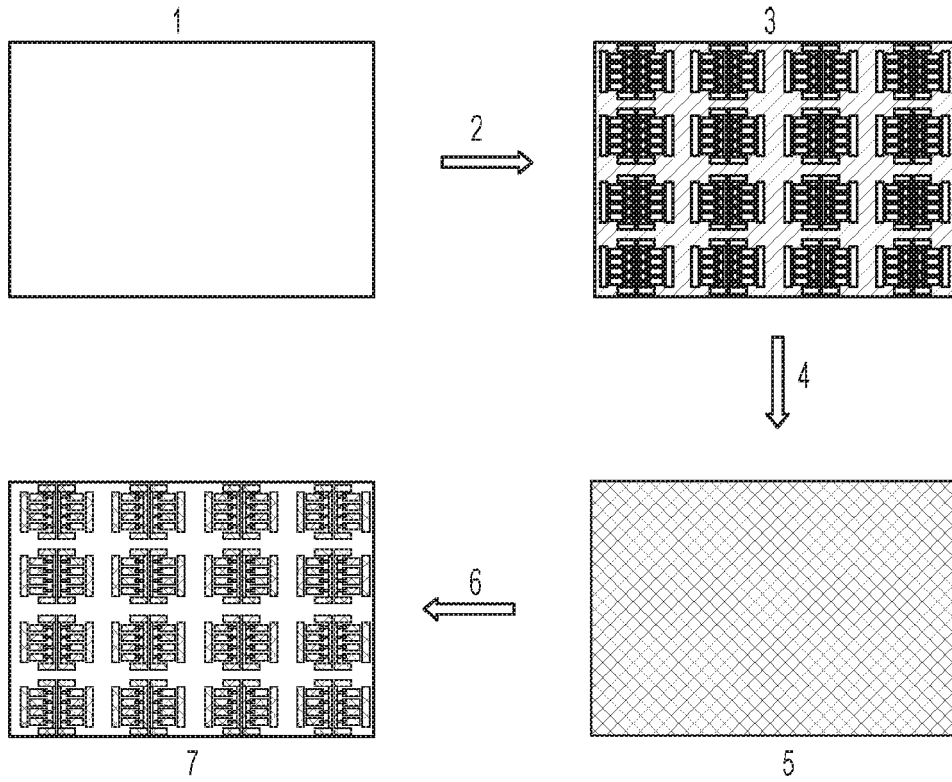


图 10

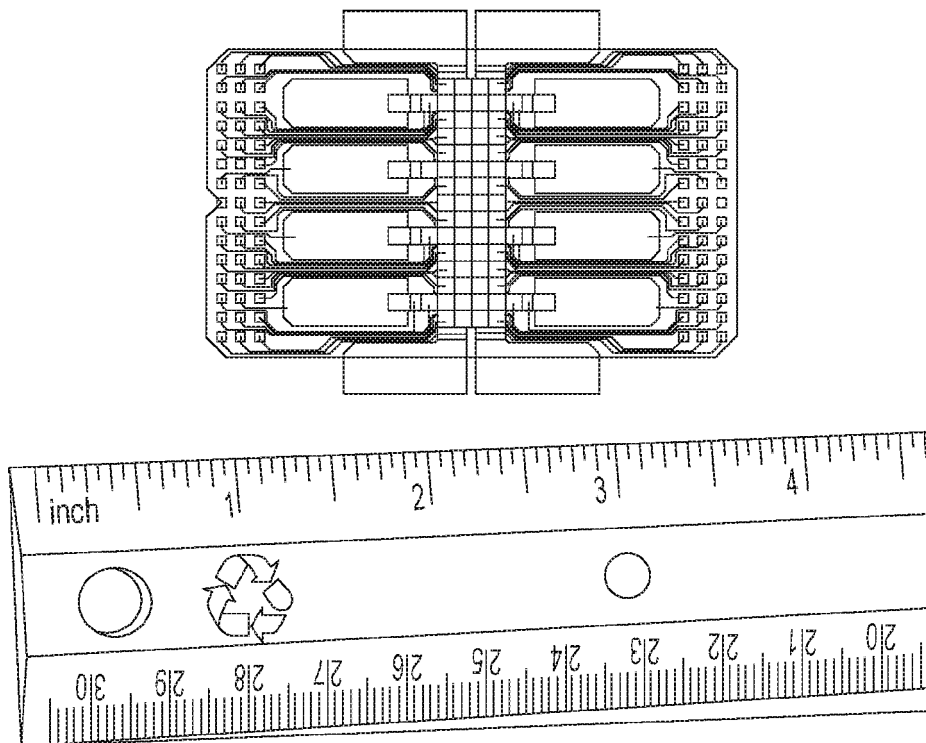


图 11

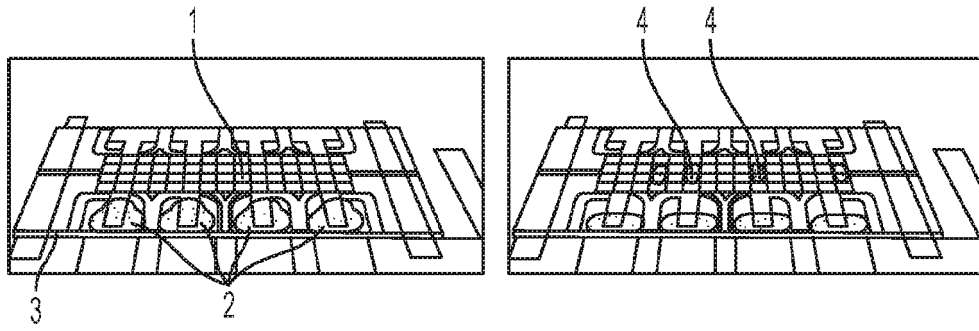


图 12

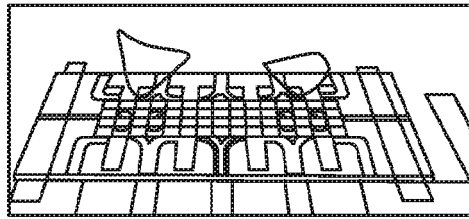


图 13A

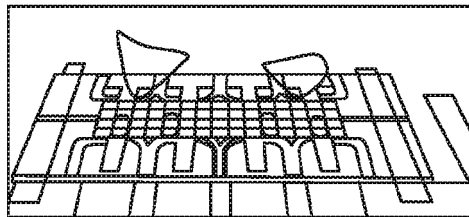


图 13B

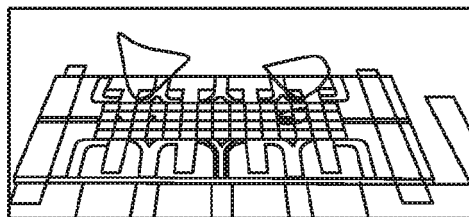


图 13C

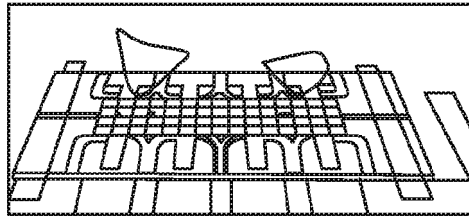
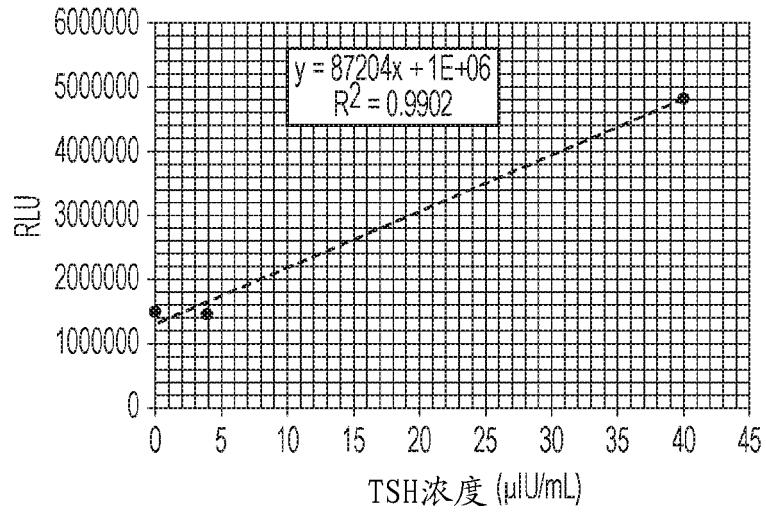


图 13D



TSH浓度	x1	x2	x3	x4	平均值
0	1523009	1540911	1832762	1173542	1517556
4	1624957	1345836			1485397
40	5181831	4508782			4845307

图 13E

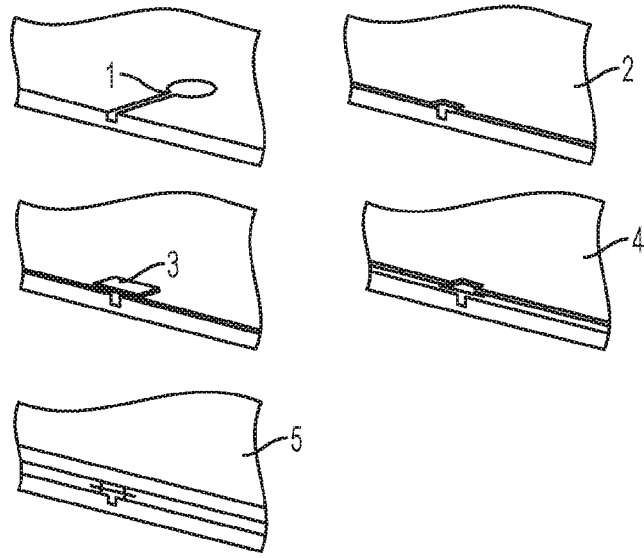


图 14A

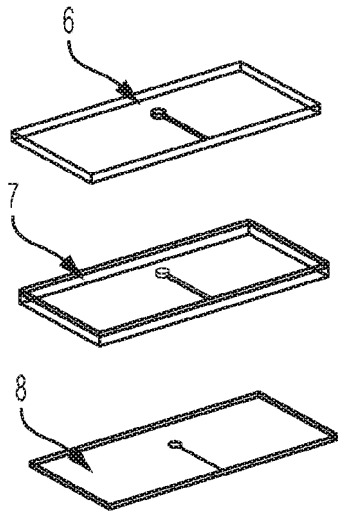


图 14B

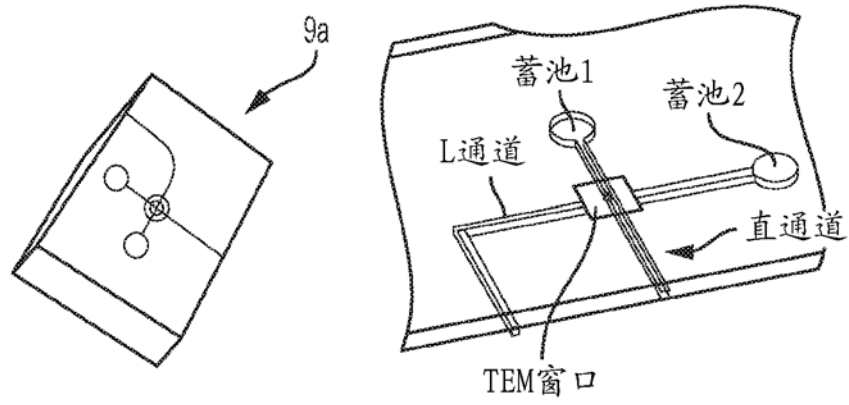


图 14C

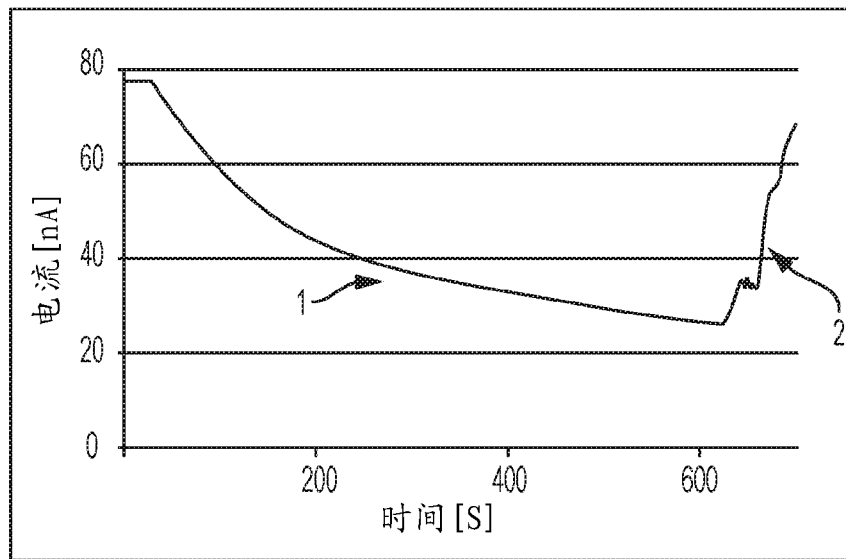


图 15A

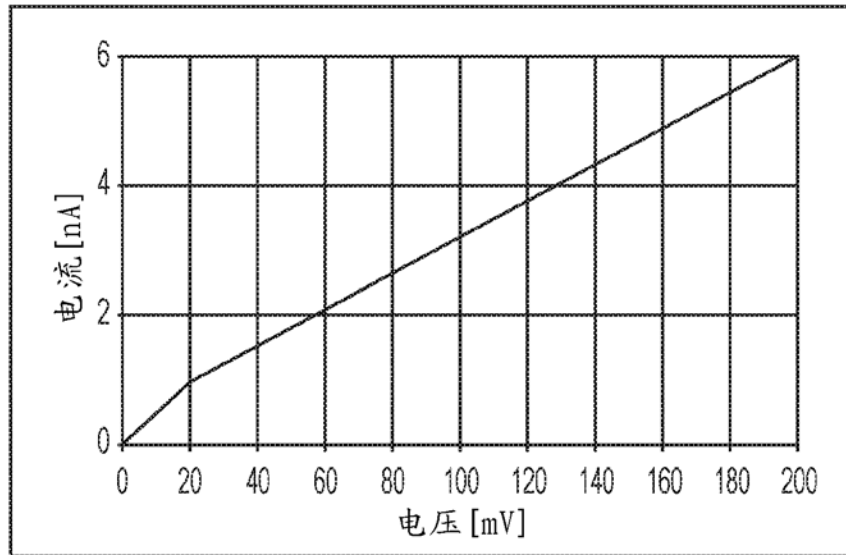


图 15B

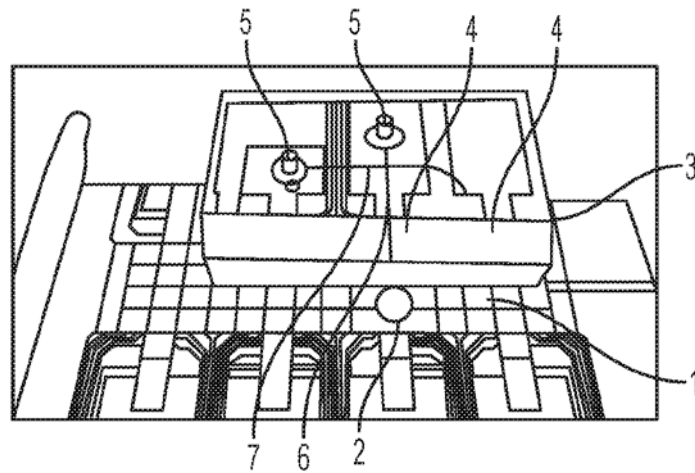


图 16A

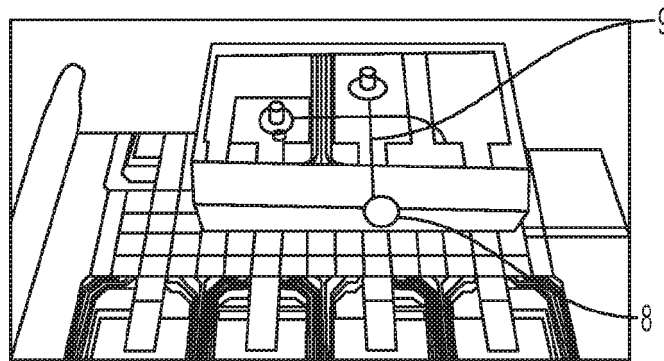


图 16B

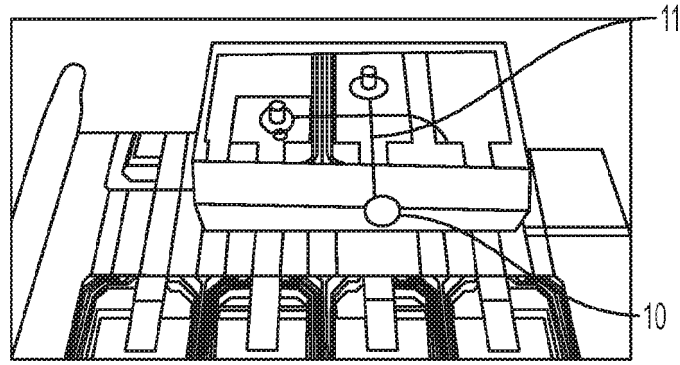


图 16C

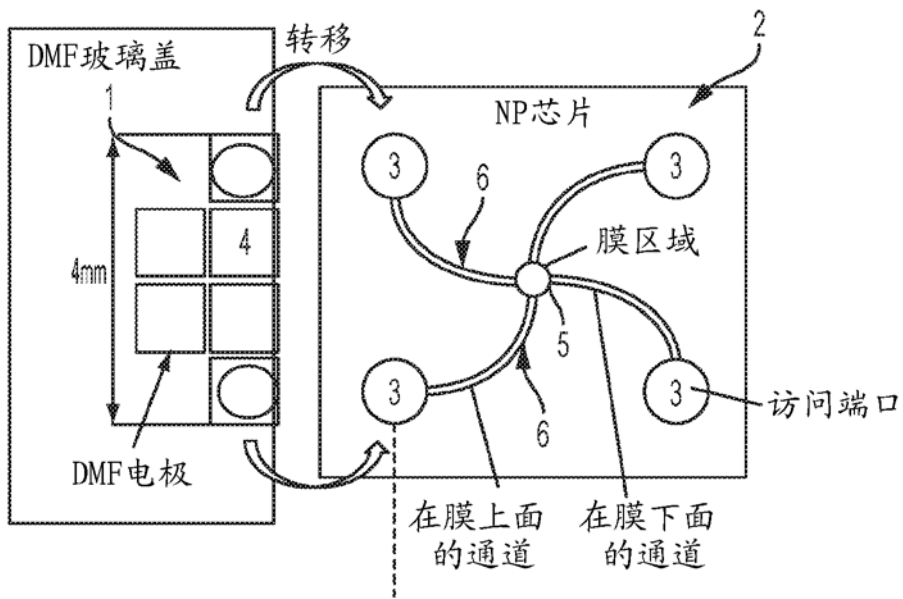


图 17

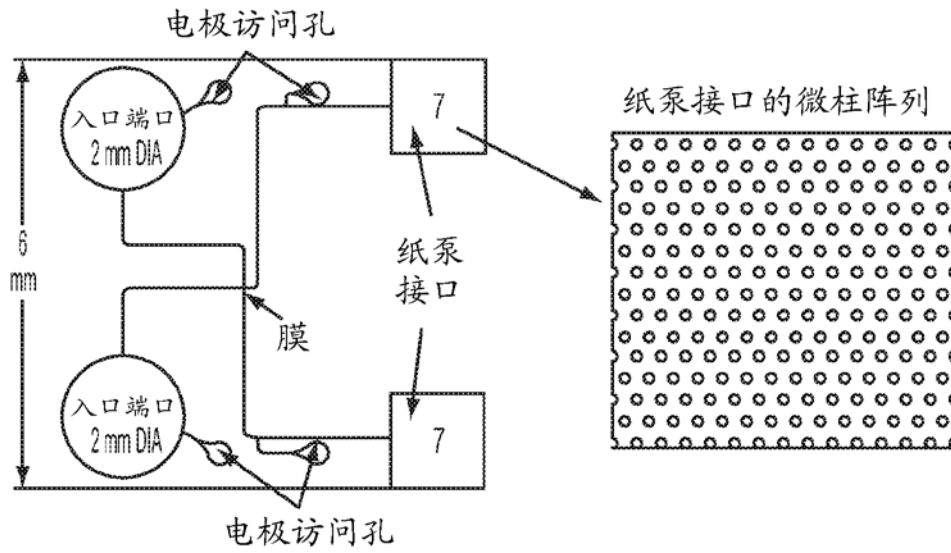


图 18

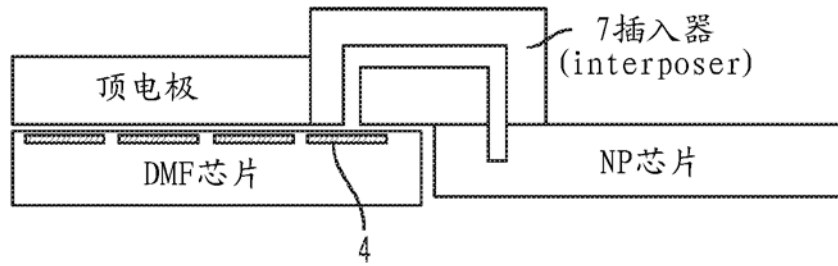


图 19

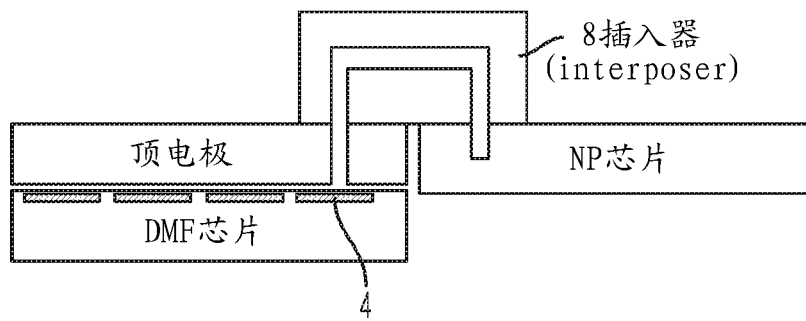


图 20

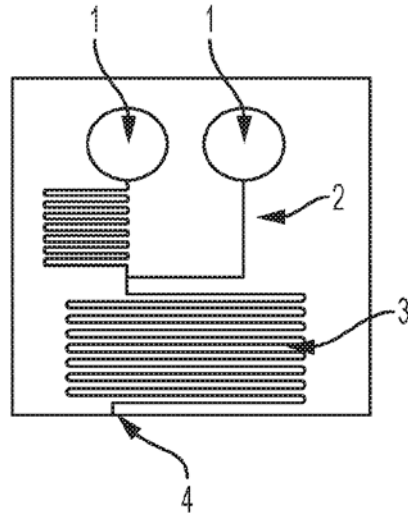


图 21

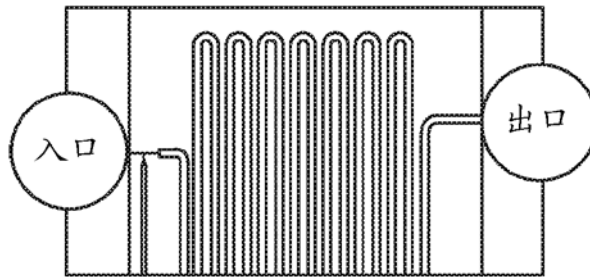


图 22

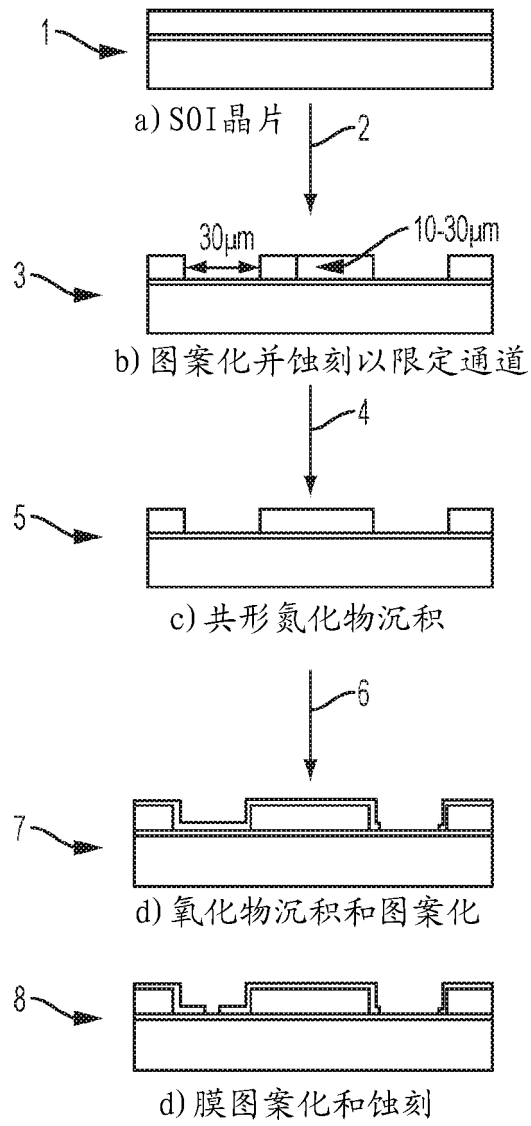


图 23A

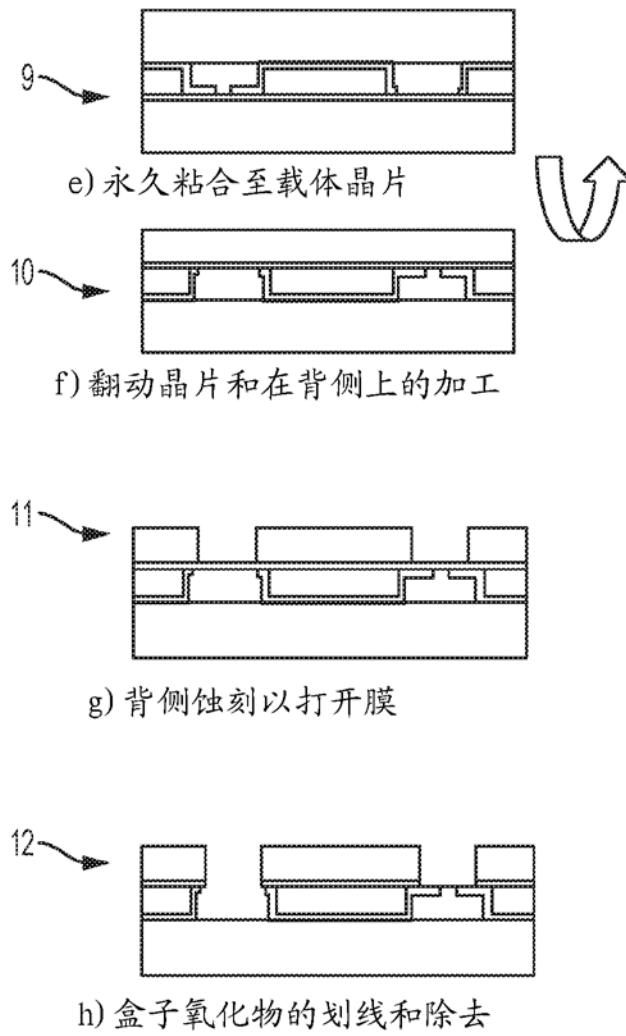


图 23B

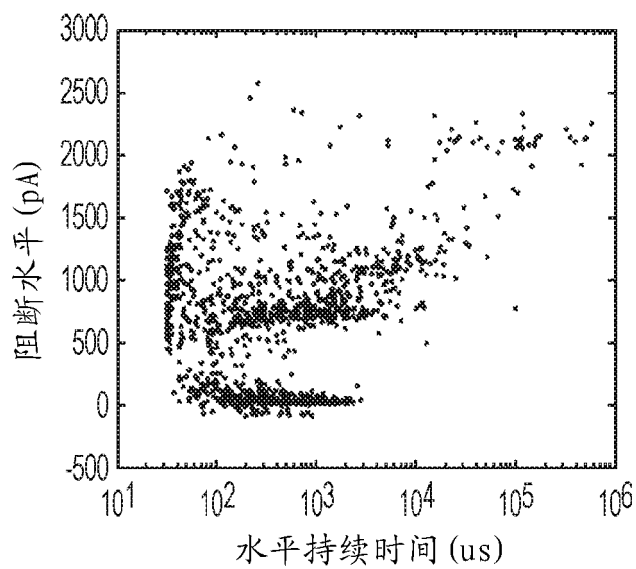


图 24A

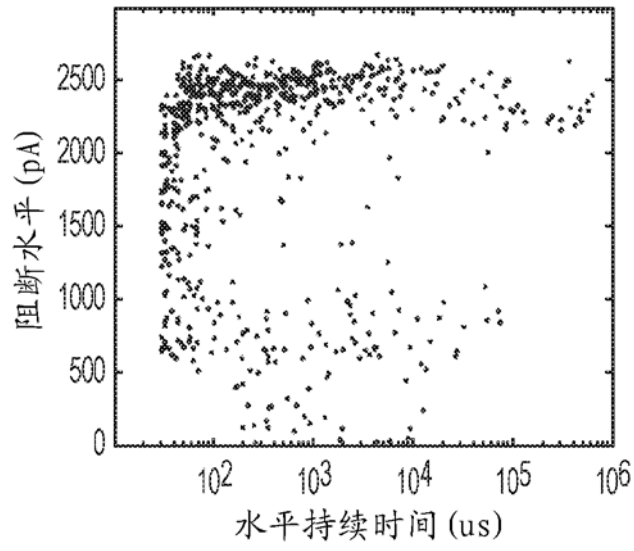


图 24B

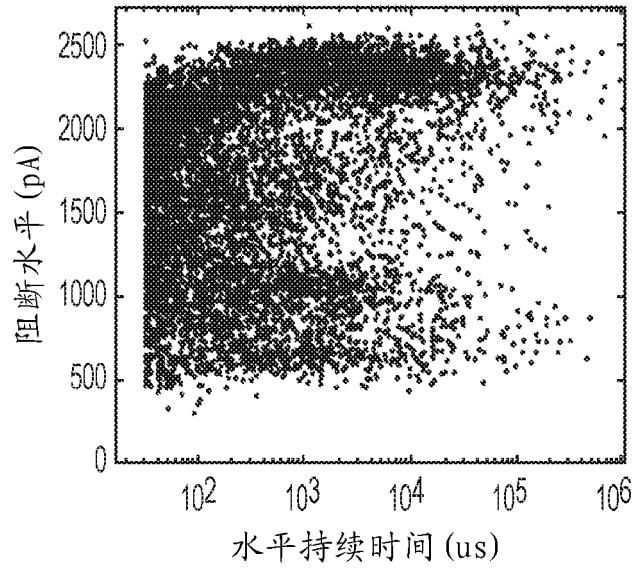


图 24C

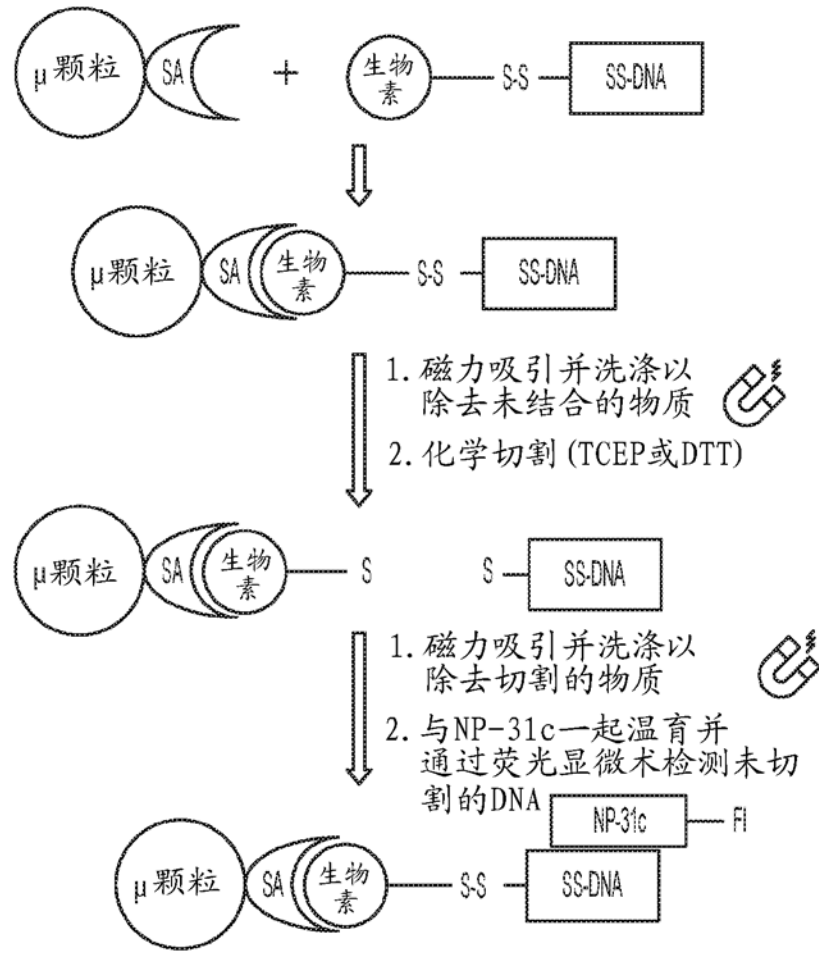


图 25

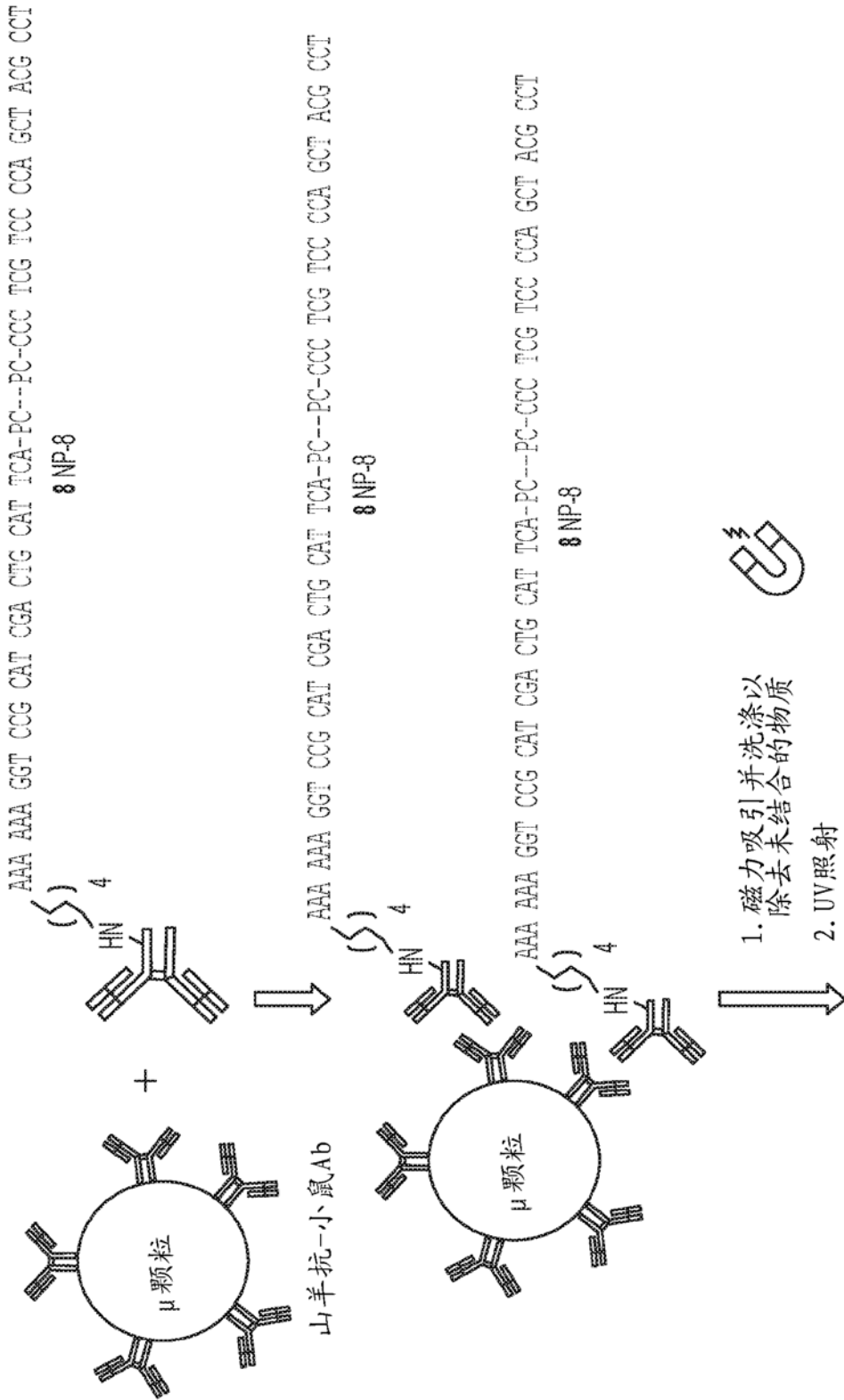


图 26A

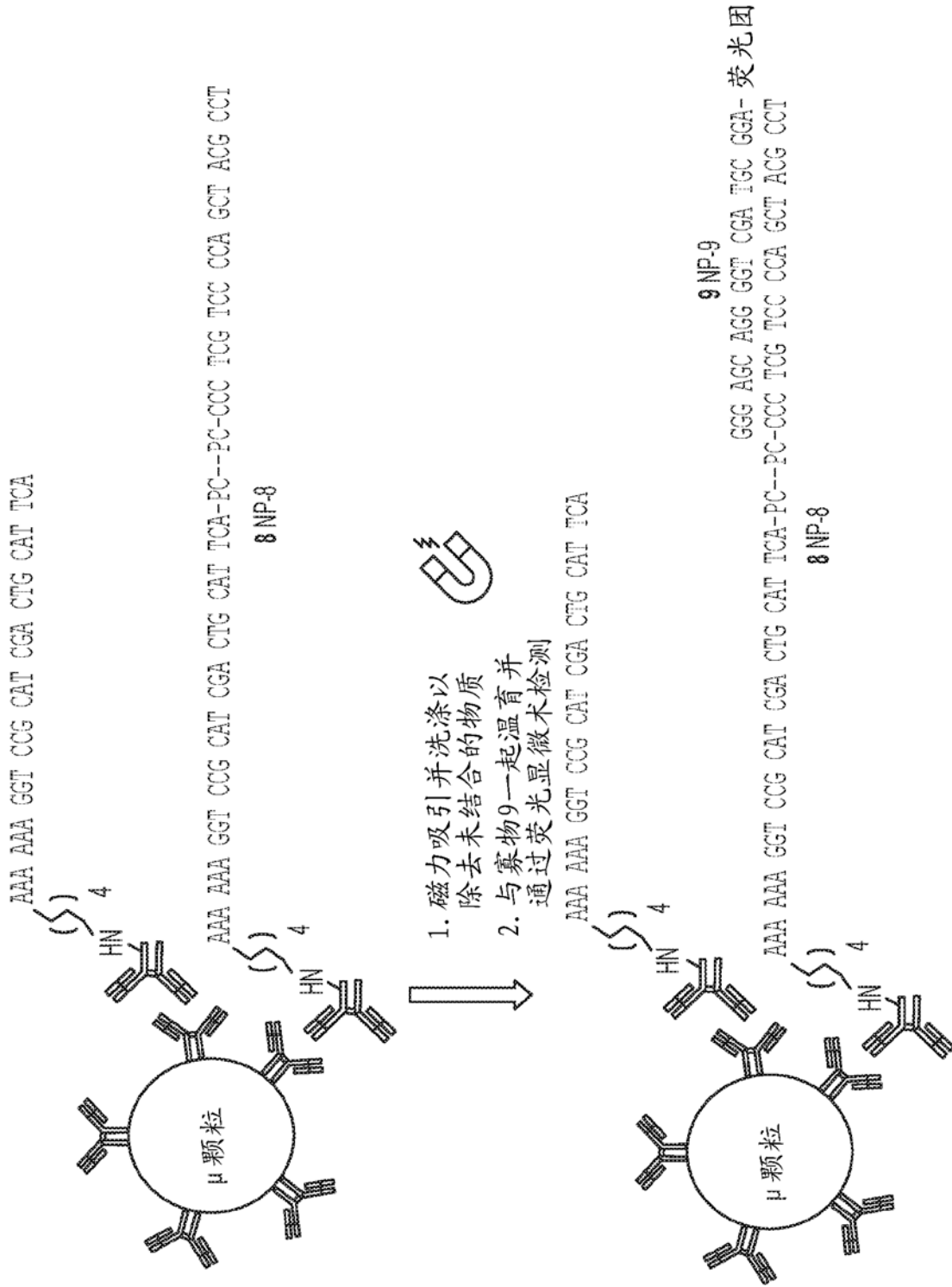


图 26B

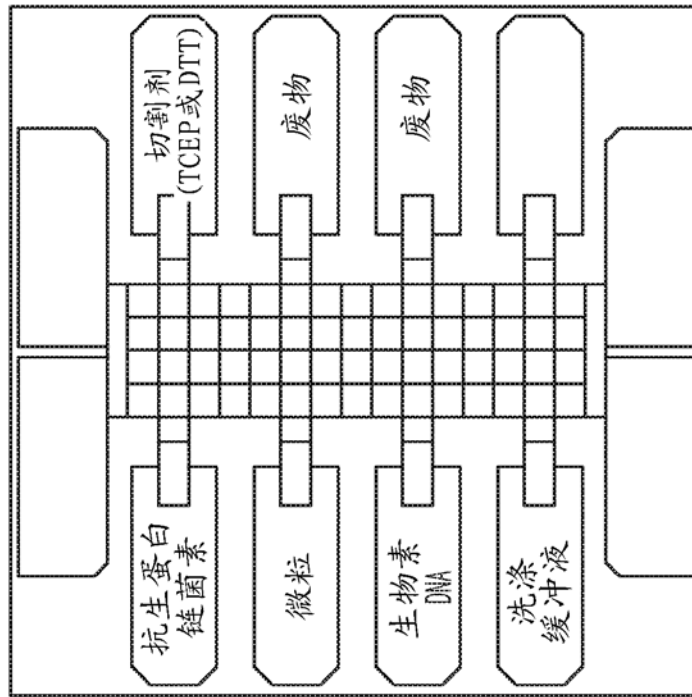


图 27

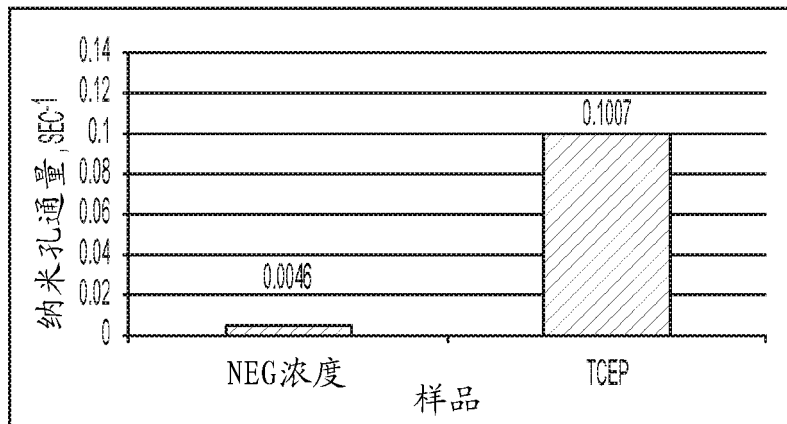


图 28

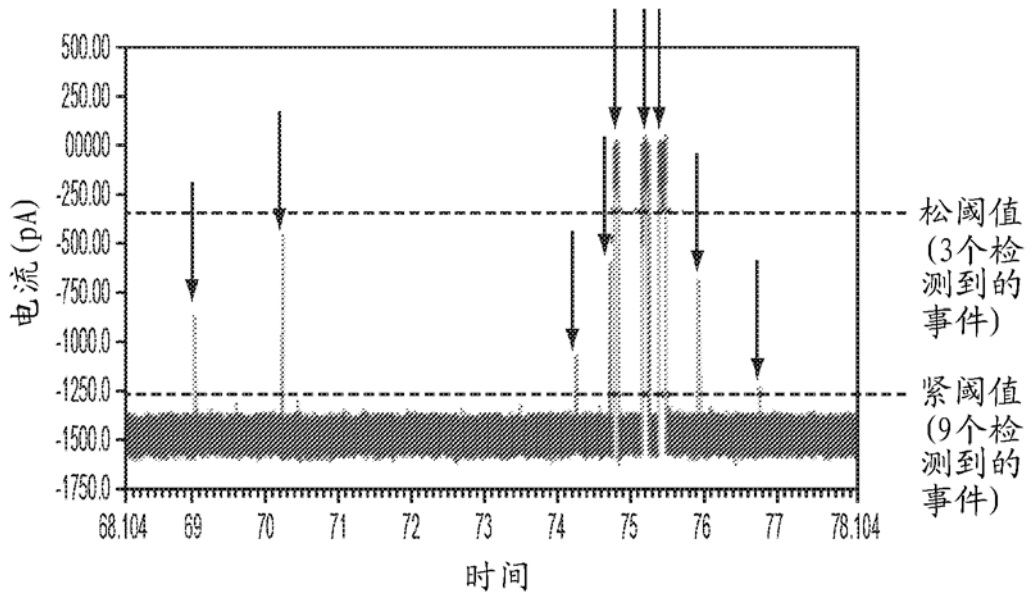


图 29

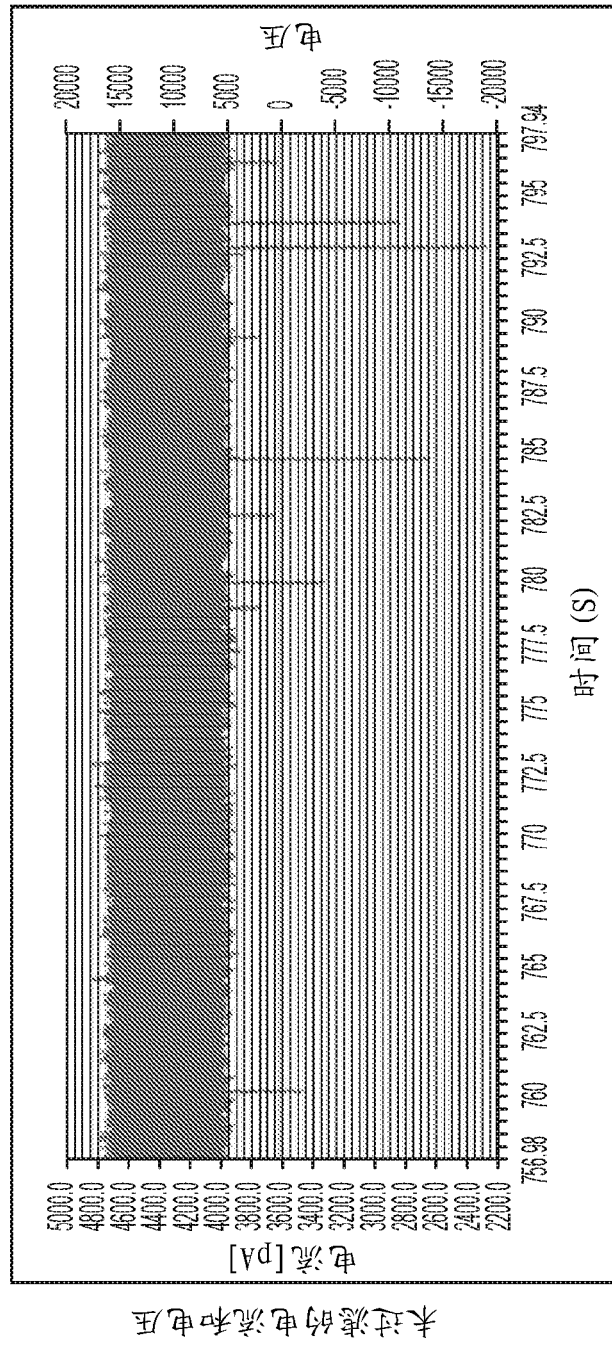
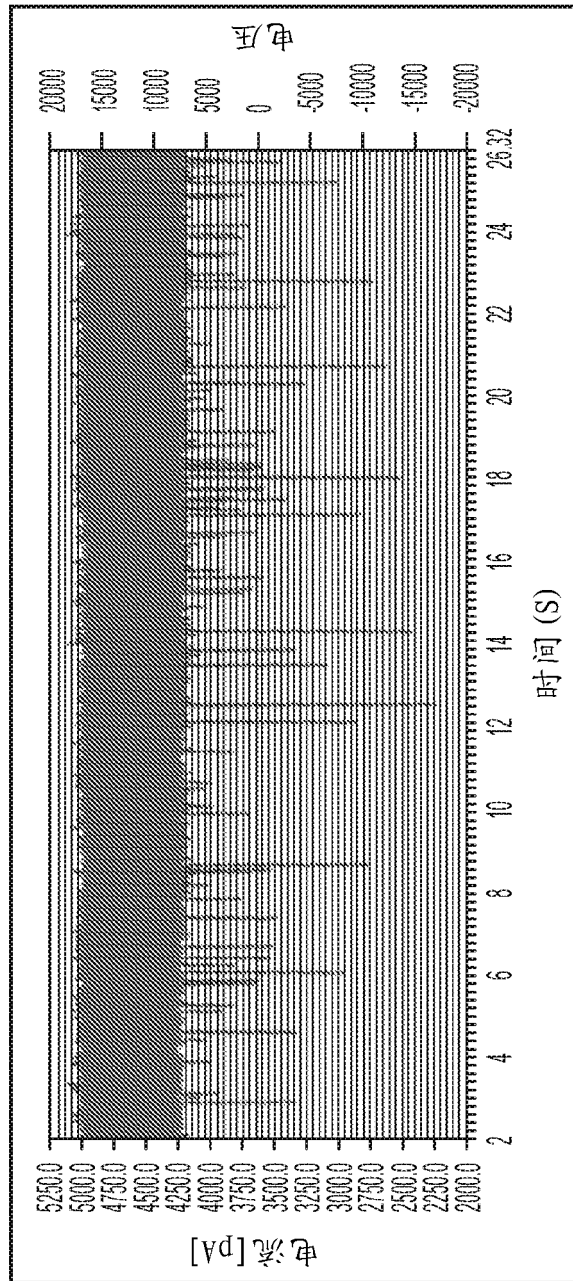


图 30A



未过滤的电流和电压

图 30B

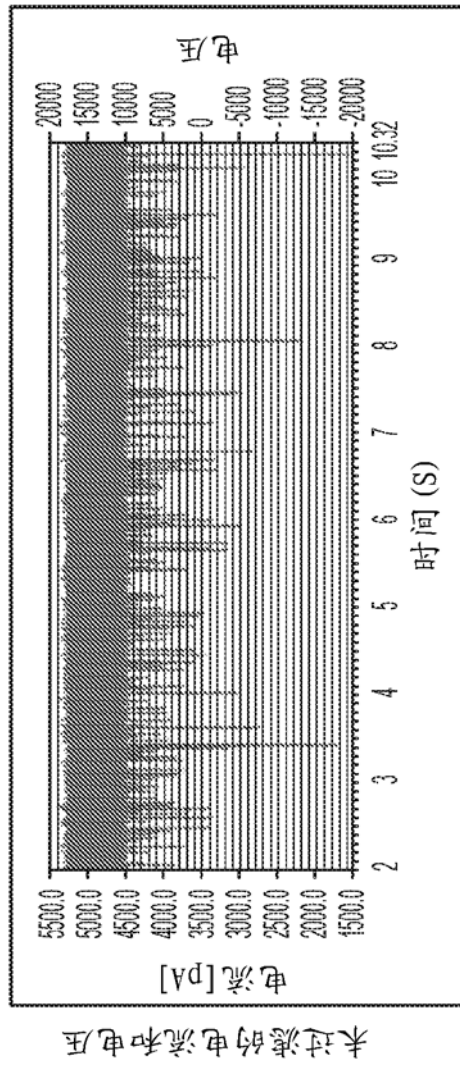


图 30C

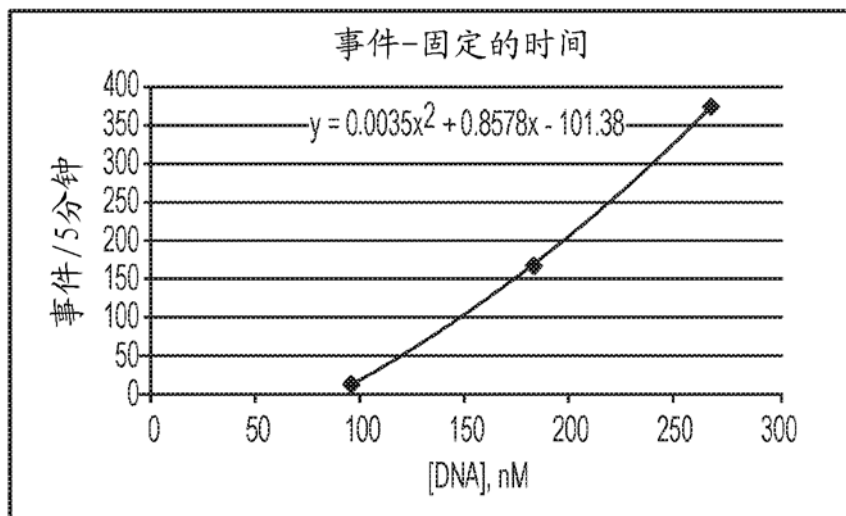


图 31

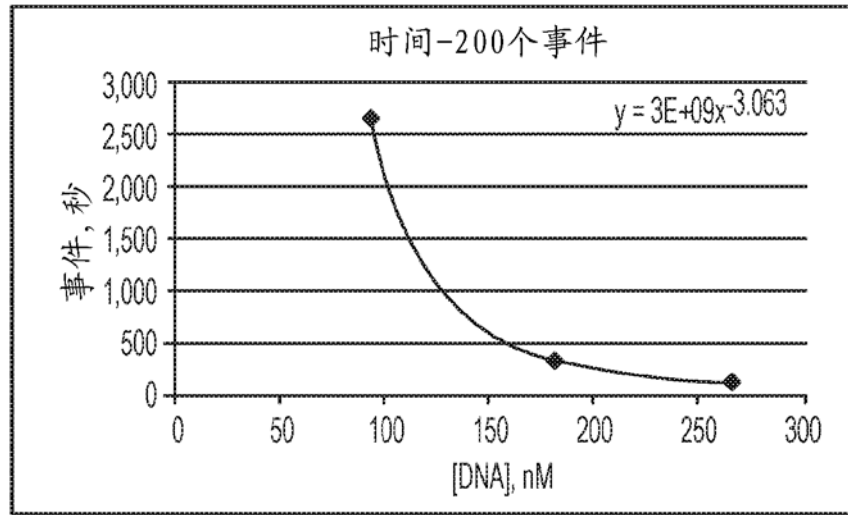


图 32

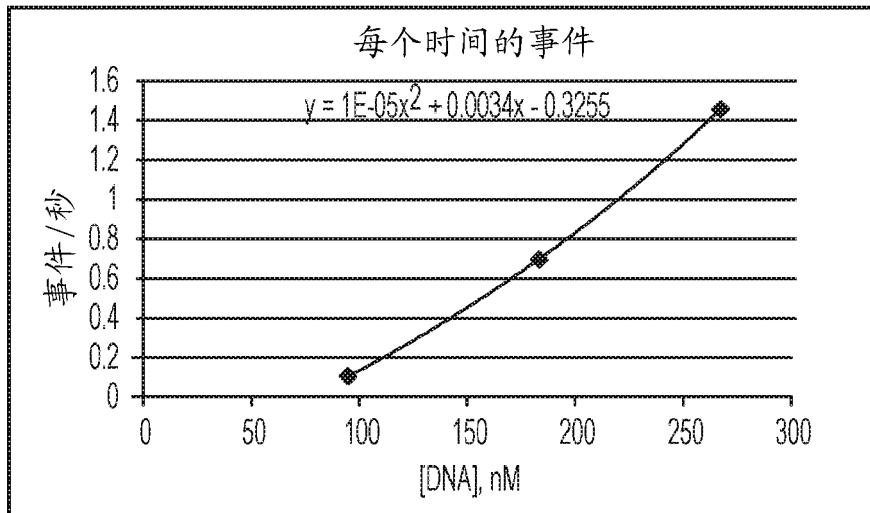


图 33

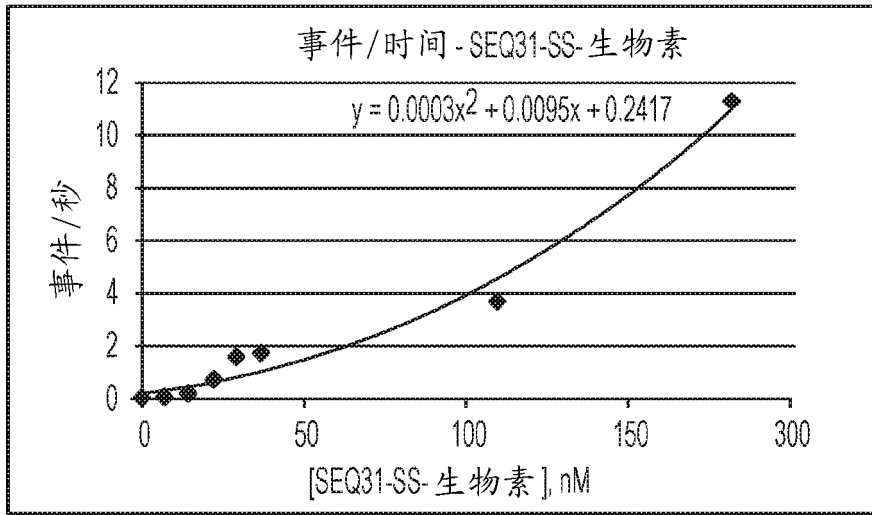


图 34

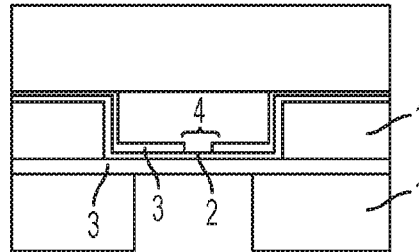


图 35

参数	值
纳米孔大小	10 nm
纳米孔形态	球状圆筒
SiNx膜大小	无限大
SiNx膜厚度	50 nM
SiNx膜粗糙度 (R _a)	0 nM
SiNx电荷密度	-30 mC/m ²
硅电阻率	30 Ω-cm
电解质浓度	1 M KCl
感知电压	-200 TO +200 mV
通道高度	725 μm
SiO ₂ 直径	0-4,500 nM
SiO ₂ 电荷密度	-50 mC/m ²
SiO ₂ 厚度	100 nm

图 36

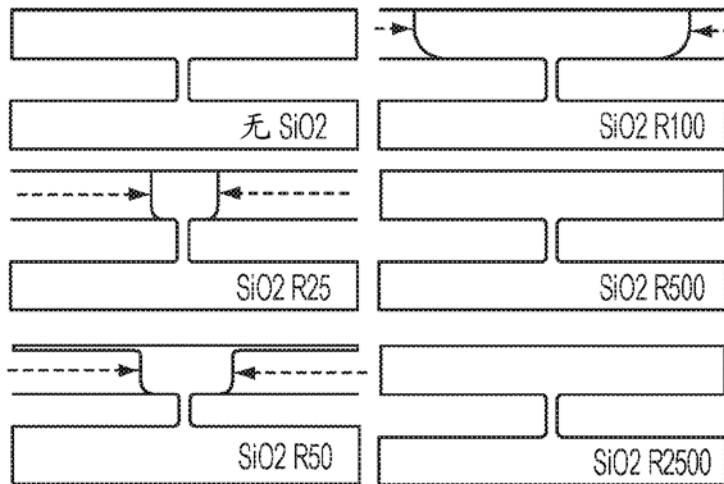


图 37

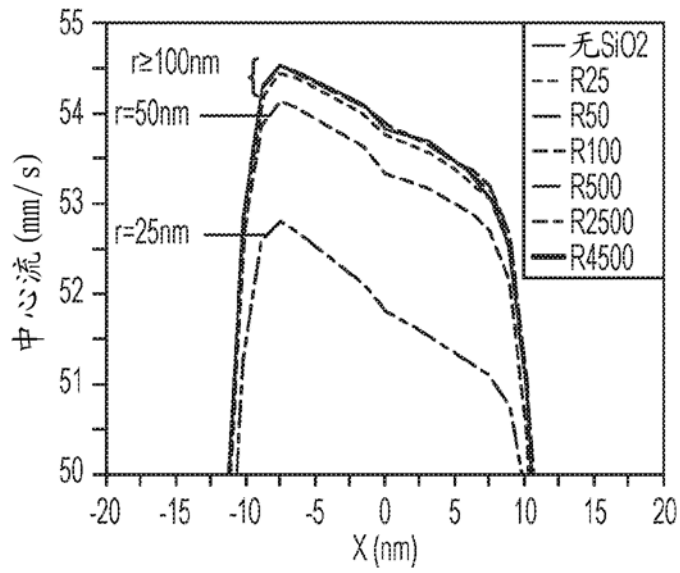


图 38

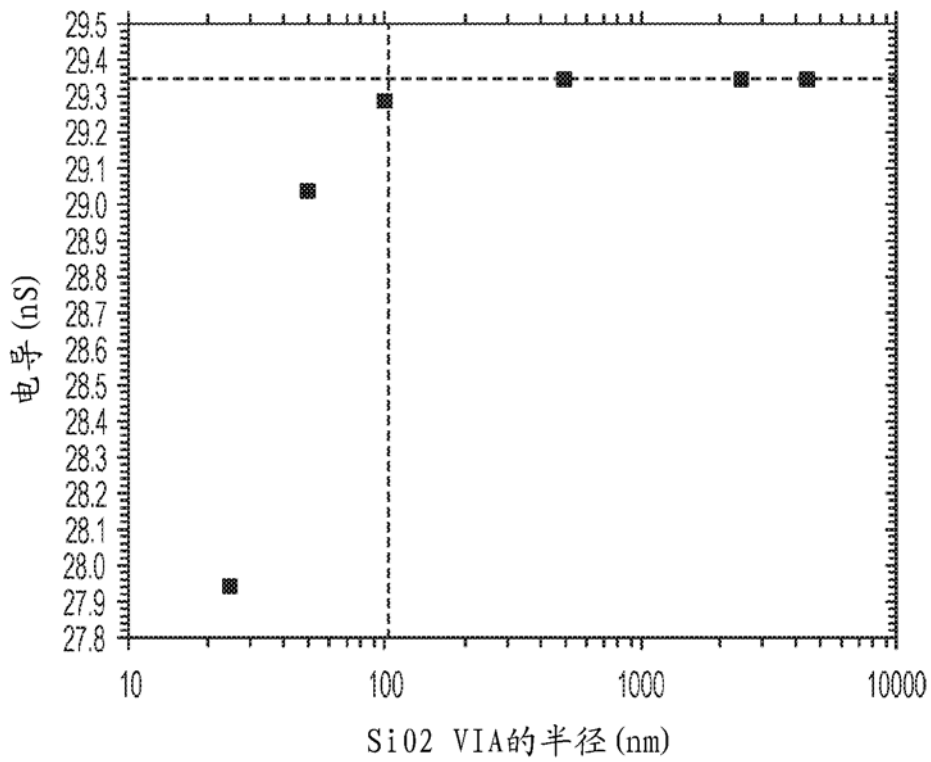


图 39

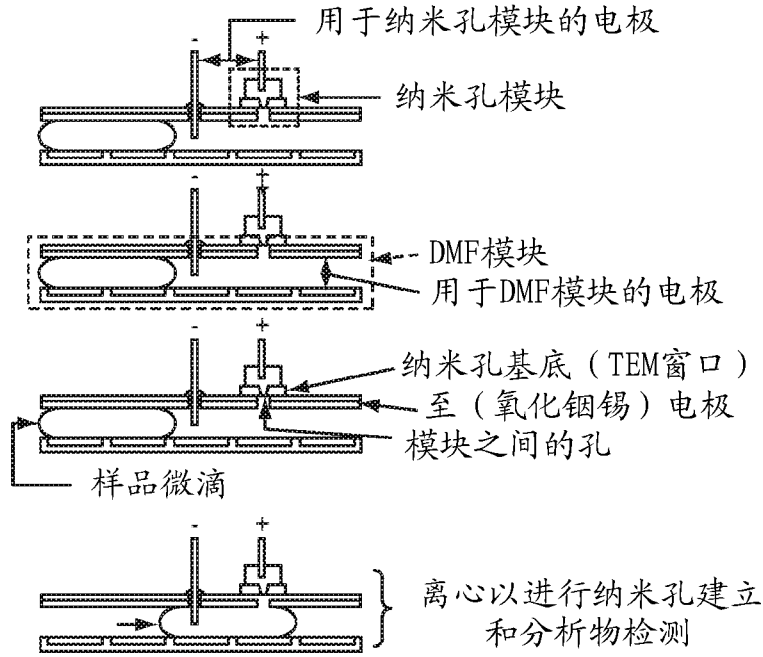


图 40

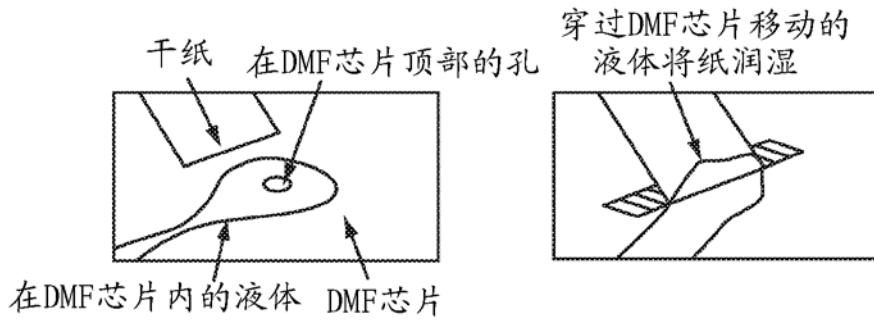


图 41

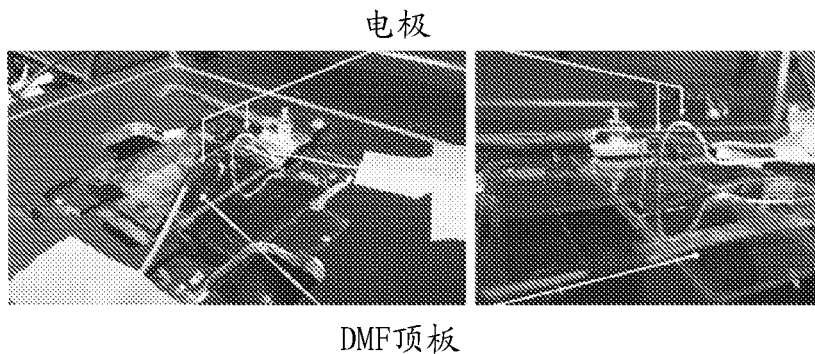


图 42

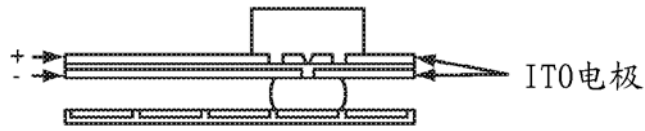


图 43

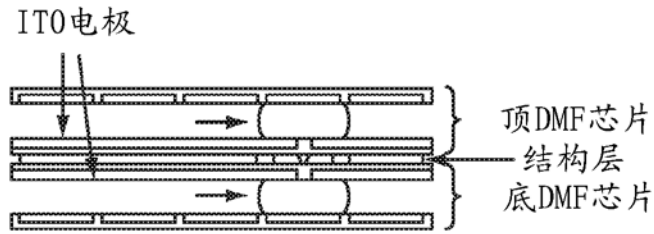


图 44

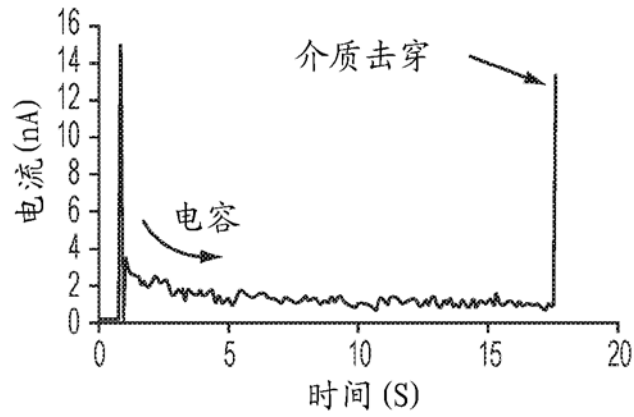


图 45

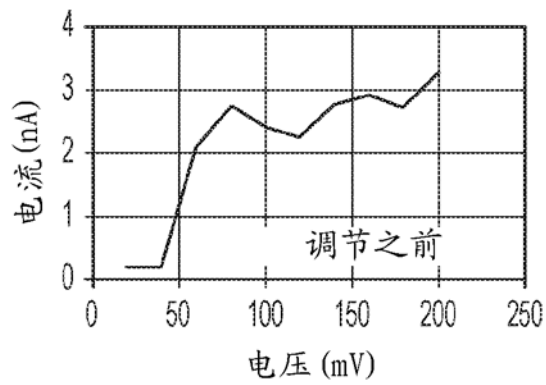


图 46A

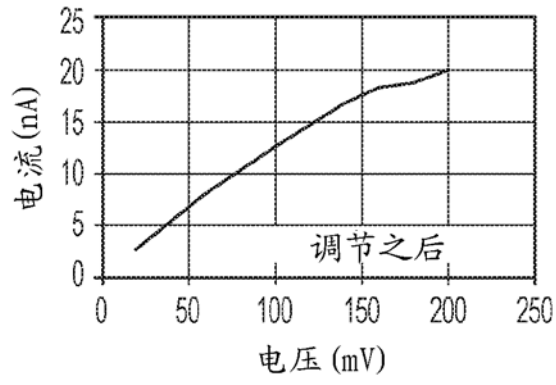


图 46B

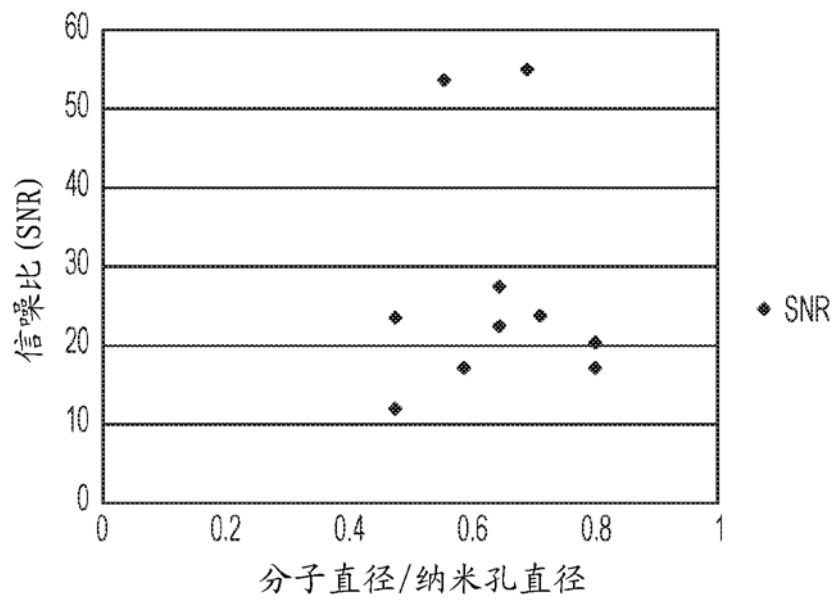


图 47

专利名称(译)	用于样品分析的装置和方法		
公开(公告)号	CN107690582A	公开(公告)日	2018-02-13
申请号	CN201680032121.1	申请日	2016-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
[标]发明人	J B 哈夫 M A 海登 P J 卡拉巴特索斯 A S 沙帕尔斯 A S 米尔霍夫 F 博丹 T 利里 S R 霍尔茨 麦考马克 S 劳伦森 A T 费希尔 R 哈克 S 赫什伯格 D 豪斯 L 乔 M S 墨菲 E M 普里托 巴伦吉 Q 阮 P 索尼 S 特丁 L 亚内尔		
发明人	J.B.哈夫 M.A.海登 P.J.卡拉巴特索斯 A.S.沙帕尔斯 A.S.米尔霍夫 F.博丹 T.利里 S.R.霍尔茨-麦考马克 S.劳伦森 A.T.费希尔 R.哈克 S.赫什伯格 D.豪斯 L.乔 M.S.墨菲 M.R.波普 E.M.普里托-巴伦吉 Q.阮 P.索尼 S.特丁 L.亚内尔		

IPC分类号	G01N33/543 G01N33/487 G01N33/53
CPC分类号	G01N33/48721 G01N33/5308 G01N33/54306 G01N2458/10 B01L3/502761 B01L2300/0645 B01L2400/0406
优先权	62/142872 2015-04-03 US 62/278303 2016-01-13 US 62/279488 2016-01-15 US
外部链接	Espacenet SIPO

摘要(译)

公开了使用纳米孔进行分析物分析的方法、装置和系统。所述方法、装置和系统利用第一结合成员和第二结合成员，它们各自特异性地结合生物样品中的分析物。所述方法还包括检测和/或计数附接到所述第二结合成员的可切割标签，和将标签的存在和/或数目与所述分析物的存在和/或浓度相关联。所述方法的某些方面没有涉及标签，而是可以直接地检测/定量第二结合成员。通过使所述标签/第二结合成员穿过纳米孔转移，可以执行检测和/或计数。还提供了被编程以实现公开的方法的装置和系统。

$$\Delta G = \frac{\sigma_{\text{DNA}}^2}{4L} \quad (S1)$$