



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109476477 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201680081327.3

玛丽娜·斯凡辛奈特斯基

(22)申请日 2016.12.08

(74)专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

(30)优先权数据

(普通合伙) 31218

62/264,913 2015.12.09 US

代理人 翟羽

62/264,944 2015.12.09 US

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

B82Y 10/00(2006.01)

2018.08.08

G01N 27/327(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

G01N 27/414(2006.01)

PCT/IL2016/051319 2016.12.08

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/098517 EN 2017.06.15

(71)申请人 拉莫特特拉维夫大学有限公司

地址 以色列特拉维夫市

(72)发明人 费尔南多·帕托洛斯基

瓦迪姆·卡利夫斯基

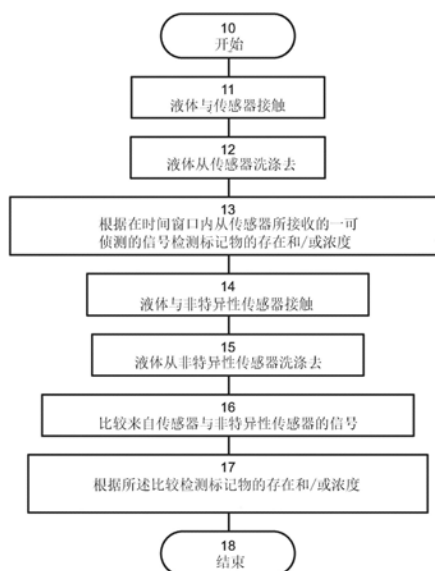
权利要求书3页 说明书21页 附图31页

(54)发明名称

通过修饰的纳米结构进行传感的方法和系统

(57)摘要

本发明揭示一种检测一液体中(例如一液体中)的一标记物(例如标记物)的存在和/或浓度的方法。所述方法包括:使所述液体与一传感器接触,所述传感器具有一固定的亲和性部分,所述亲和性部分与所述标记物相互作用,并且所述传感器配置用以因应于所述相互作用产生一可检测的信号。所述方法进一步包括:将所述液体从所述传感器洗涤去;以及根据在所述洗涤的一开始时间之后于一预定时间段开始的一时间窗口内从所述传感器所接收的一可检测的信号,来检测所述标记物的存在和/或浓度。



1. 一种用于检测一液体中一标记物的存在和/或浓度的方法,其特征在于:所述方法包括:

使所述液体与一传感器接触,所述传感器具有一固定的亲和性部分,所述亲和性部分与所述标记物相互作用,并且所述传感器配置用以因应于所述相互作用产生一可检测的信号,所述相互作用以一 K_D 值为特征或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-5}M$;

将所述液体从所述传感器洗涤去;以及

根据在所述洗涤的一开始时间之后于一预定时间段开始的一时间窗口内从所述传感器所接收的一可检测的信号,来检测所述标记物的存在和/或浓度。

2. 如权利要求1的方法,其特征在于:所述标记物是一生物标记物。

3. 如权利要求1和2中任一项所述的方法,其特征在于:所述液体是一生物液体。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述检测并非根据在所述时间窗口的所述开始时间之前从所述传感器所接收的信号。

5. 如权利要求2至3中任一项所述的方法,其特征在于:所述检测并非根据在所述时间窗口的所述开始时间之前从所述传感器所接收的信号。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述预定时间段是至少30秒。

7. 如权利要求2至5中任一项所述的方法,其特征在于:所述预定时间段是至少30秒。

8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述方法还包括:从所述洗涤的所述开始就监测所述可检测的信号,并根据所述信号的一时间依赖性的一变化,识别所述时间窗口的所述开始。

9. 如权利要求2至7中任一项所述的方法,其特征在于:所述方法还包括:从所述洗涤的所述开始就监测所述可检测的信号,并根据所述信号的一时间依赖性的一变化,识别所述时间窗口的所述开始。

10. 如权利要求8所述的方法,其特征在于:所述时间窗口的所述开始是在所述信号的一变化率以绝对值而言低于一预定阈值的一时间点所定义。

11. 如权利要求9所述的方法,其特征在于:所述时间窗口的所述开始是在所述信号的一变化率以绝对值而言低于一预定阈值的一时间点所定义。

12. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述亲和性部分包含一免疫原性部分。

13. 如权利要求2至10中任一项所述的方法,其特征在于:所述亲和性部分包含一免疫原性部分。

14. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述免疫原性部分包含一抗体或一抗体片段。

15. 如权利要求2至10中任一项所述的方法,其特征在于:所述免疫原性部分包含一抗体或一抗体片段。

16. 如权利要求1的方法,其特征在于:所述免疫原性部分包含一抗原,并且其中所述标记物是一生物标记物,所述生物标记物包含针对所述抗原的一抗体。

17. 如权利要求2至10中任一项所述的方法,其特征在于:所述免疫原性部分包含一抗原,并且其中所述标记物是一生物标记物,所述生物标记物包含针对所述抗原的一抗体。

18. 如权利要求1的方法,其特征在于:所述亲和性部分包含一配体,并且所述标记物是包含一受体的一生物标记物。

19. 如权利要求2至10中任一项所述的方法,其特征在于:所述亲和性部分包含一配体,并且所述标记物是包含一受体的一生物标记物。

20. 如权利要求1的方法,其特征在于:所述方法还包括:使所述液体与对所述标记物为非特异性的一传感器接触,并且还将所述液体从所述非特异性的传感器洗涤去,其中检测所述标记物的存在和/或浓度是根据所述可检测的信号与从所述非特异性的传感器所接收的一背景信号之间的比较。

21. 如权利要求2至10中任一项所述的方法,其特征在于:所述方法还包括:使所述液体与对所述标记物为非特异性的一传感器接触,并且还将所述液体从所述非特异性的传感器洗涤去,其中检测所述标记物的存在和/或浓度是根据所述可检测的信号与从所述非特异性的传感器所接收的一背景信号之间的比较。

22. 一种用于检测一液体中一标记物的存在和/或浓度的系统,其特征在于:所述系统包括:

一流体装置,具有一传感腔室与位于所述传感腔室中的一传感器,所述传感器具有一固定的亲和性部分,所述亲和性部分与所述标记物相互作用,并且所述传感器配置用以因应于所述相互作用产生一可检测的信号,所述相互作用以一 K_D 值为特征或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-5}M$;

一流量控制系统,用于将一洗涤缓冲液引入所述腔室,以将所述液体从所述传感器洗涤去;以及

一信号分析器,用于在所述洗涤的一开始时间之后,于一预定时间段开始的一时间窗口内,分析根据从所述传感器所接收的一可检测的信号,以检测所述标记物的存在和/或浓度。

23. 如权利要求22的系统,其特征在于:所述信号分析器配置用以丢弃在所述时间窗口的所述开始时间之前从所述传感器接收的所述分析信号。

24. 如权利要求22和23中任一项所述的方法,其特征在于:所述预定时间段是至少30秒。

25. 如权利要求22至24中任一项所述的方法,其特征在于:所述信号分析器被配置用以从所述洗涤的所述开始就监测所述可检测的信号,并根据所述信号的一时间依赖性的一变化,识别所述时间窗口的所述开始。

26. 如权利要求25的系统,其特征在于:所述时间窗口的所述开始是在所述信号的一变化率以绝对值而言低于一预定阈值的一时间点所定义。

27. 如权利要求22至26中任一项所述的系统,其特征在于:所述流体装置还包括一传感器,所述传感器对所述传感腔室中所述标记物为非特异性,所述信号分析器配置用以比较所述可检测的信号与从所述非特异性的传感器所接收的一背景信号,以根据所述比较来检测所述标记物的存在和/或浓度。

28. 如权利要求1和22中任一项所述的方法或系统,其特征在于:所述传感器是一纳米结构,并且所述亲和性部分固定在所述纳米结构的一表面上。

29. 如权利要求1至26中任一项所述的方法或系统,其特征在于:所述传感器是一纳米结构,并且所述亲和性部分固定在所述纳米结构的一表面上。

30. 如权利要求1和22中任一项所述的方法或系统,其特征在于:所述传感器是一晶体

管。

31. 如权利要求1至26中任一项所述的方法或系统,其特征在于:所述传感器是一晶体管。

32. 如权利要求1和22中任一项所述的方法或系统,其特征在于:所述传感器是一晶体管,所述晶体管具有一纳米结构作为一通道,并且其中所述亲和性部分固定在所述纳米结构的一表面上。

33. 如权利要求1至26中任一项所述的方法或系统,其特征在于:所述传感器是一晶体管,所述晶体管具有一纳米结构作为一通道,并且其中所述亲和性部分固定在所述纳米结构的一表面上。

34. 如权利要求30所述的方法或系统,其特征在于:所述晶体管是一场效应晶体管。

35. 如权利要求32所述的方法或系统,其特征在于:所述晶体管是一场效应晶体管。

通过修饰的纳米结构进行传感的方法和系统

[0001] 相关申请案

[0002] 此案主张的优先权为皆于2015年12月9日提交申请的美国临时专利申请案第62/264,913号和第62/264,944号,其内容通过引用的方式并入本文整体中。

[0003] 技术领域和背景技术

[0004] 在本发明的一些实施例中,本发明涉及传感,并且更具体地但非排他地,涉及用于检测标记物的方法和系统,所述标记物例如但不限于液体中的生物标记物,例如但不限于生物液体。

[0005] 高效生物分子分离和纯化技术的发展在现代基因组学、蛋白质组学和生物传感领域具有重要意义,主要是因为大多数生物样品是高度多样性和复杂性的混合物。大多数目前实践的技术缺乏快速和选择性地从复杂生物样品中分离和浓缩特定靶蛋白的能力,并且难以与芯片实验室(lab-on-a-chip)传感装置整合。

[0006] 已知半导体纳米线材对吸附在其表面上的化学物质极其敏感。对于纳米线装置,带电分析物与纳米线材表面的结合导致电导变化或流过导线的电流变化。一微纳米级形态和极高的表面与体积比率,使得根据纳米线材的传感器与平面场效应晶体管(field-effect transistors, FET)的电导变化更大,增加了对一点的灵敏度,从而使得对单一分子的检测是可能的。

[0007] 因此,根据纳米线材的场效应晶体管(Nanowire-based field-effect transistors, NW-FET)在过去十年中被认为是用于检测化学和生物物种的强大潜在新型传感器。例如参见,Patolsky等人所著,于分析化学期刊Analytical Chemistry 78,4260-4269(2006);Stern等人所著,于电子装置IEEE交易期刊IEEE Transactions on Electron Devices 55,3119-3130(2008);Cui等人所著,于科学期刊Science 293,1289-1292(2001);Patolsky等所著,于美利坚合众国国家科学院院刊101,14017-14022(2004),均通过引用并入本文,如同在此完全阐述一样。

[0008] 还用纳米线材电装置进行了研究,用于同时多重检测(simultaneous multiplexed)医学诊断相关的多种生物分子物质,例如DNA和蛋白质[Zheng等,自然生物技术期刊Nature Biotechnology 23,1294-1301(2005);Timko等人所著,纳米文献期刊Nano Lett 9,914-918(2009);Li等人所著,纳米文献期刊Nano Lett 4,245-247(2004)]。

[0009] 通常,在NW-FET配置中,栅电压控制一给定源漏电压(VSD)的沟道电导,并且栅电压(VGD)的调制改变测量的源-漏极电流(ISD)。对于作为FET操作的NW传感器,传感机制是带电荷分子对NW内载流子传导(carrier conduction)的场选通效应(field-gating effect)。与由微尺寸材料或大型材料(bulk material)制成的装置相比,纳米装置的增强灵敏度与减小尺寸和更大的表面/体积比率有密切相关。由于大多数生物分析物分子具有固有电荷,因此在纳米线材表面上的结合可以用作为半导体SiNW上的分子栅[Cui等人所著,2001,同上]。

[0010] 抗体/酵素纳米线材FET装置,其通过结合亲和性以代谢物作为目标,例如已被Lu等人公开,生物电化学2007,71(2):211-216;Patolsky等人所著,根据纳米线材的生物传感

器,于分析化学期刊Anal Chem 2006,78(13):4260-4269;和杨等人所著,纳米技术期刊Nanotechnology 2006,17(11):S276-S279。

[0011] 通过氧化反应检测代谢物的电化学敏感的纳米线材传感器,已在例如Lu等人的文献中公开,生物传感生物电子期刊Biosens Bioelectron 2009,25(1):218-223;Shao等人所著,先进功能物质Adv Funct Mater 2005,15(9):1478-1482;Su等人所著,粒子与粒子系统表征Part Part Syst Char 2013,30(4):326-331;和Tyagi等人所著,于分析化学Anal Chem 2009,81(24):9979-9984。

[0012] 美国专利号No.7,619,290,具有公开号为2010/0022012的美国专利申请案,以及相应的申请案,教导纳米级装置,其尤其由官能化的纳米线材组成,其可用作传感器。

[0013] Clavaguera等人公开一种使用化学官能性硅纳米带件(nanoribbon)场效应晶体管进行亚ppm(sub-ppm)检测神经毒剂的方法[Clavaguera等人所著,应用化学期刊国际版Angew.Chem.Int.Ed.2010,49,1-5]。

[0014] 二氧化硅表面化学用于构建“纳米电子鼻”资料库,可通过分布反应区分丙酮和己烷蒸气[自然物质期刊Nature Materials Vol.6,2007,pp.379-384]。

[0015] 公开号为2010/0325073的美国专利申请案公开了设计用于吸收气态NO的纳米装置。世界知识产权组织的专利公开号W02011/000443描述了纳米装置,其利用官能化的纳米线材来检测含硝基化合物。

[0016] Duan等人所著[自然纳米科技Nature Nanotechnology,Vol.7,2012,pp.174-179]描述了硅纳米线材FET检测器和电绝缘的二氧化硅纳米管,其将FET连接到细胞内流体(胞质溶胶cytosol)。当跨膜电位 V_m 发生变化时,纳米管内的胞质溶胶的变化电位引起FET的电导G的变化。

[0017] Kosaka等人所著[自然纳米科技Nature Nanotechnology,Vol.9,2014,pp.1047-1053]公开使用表面锚定抗体,检测血清中癌症生物标记物。

[0018] Krivitsky等人所著[纳米文献期刊Nano letters 2012,12(9):4748-4756]描述了芯片上全SiNW过滤(on-chip all-SiNW filtering),选择性分离、脱盐和预浓缩平台,用于直接分析全血和其他复杂生物样品。首先使用超大结合表面区域的抗体修饰的粗糙度控制SiNW丛林(forest),执行所需蛋白质分析物与原始生物样品的分离,然后在受控液体基质中释放靶蛋白,随后通过在同一芯片平台上制造的基于SiNW的FET阵列进行检测。

[0019] W02015/059704公开一种集成的微流体纳米结构传感系统,其包括一或多个传感隔室,其特征在于氧化还原反应性纳米结构FET阵列,其与一或多个样品室流体连通。所述系统已证明可以对生理溶液中的细胞代谢活动进行多重实时(multiplex real-time)监测,并被证明是促进对个体医学的代谢网络和癌症需求的理解的有效工具。

[0020] 另外的背景技术例如包括Chen等人所著,今日纳米期刊Nano Today(2011)6,131-54,以及其中引用的参考文献;和Stern等人所著,自然纳米科技期刊Nature Nanotechnology,2009。

发明内容

[0021] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供一种用于检测一液体中一标记物的存在和/或浓度的方法。所述方法包括:使所述液体与一传感器接触,所述传感器具有一固定的

亲和性部分,所述亲和性部分与所述标记物相互作用,并且所述传感器配置用以因应于所述相互作用产生一可检测的信号。所述方法还包括将所述液体从所述传感器洗涤去;以及根据在所述洗涤的一开始时间之后于一预定时间段开始的一时间窗口内从所述传感器所接收的一可检测的信号,来检测所述标记物的存在和/或浓度。

[0022] 根据本发明的一些实施例,所述标记物是一生物标记物。

[0023] 根据本发明的一些实施例,所述液体是一生物液体。

[0024] 根据本发明的一些实施例,所述检测并非根据在所述时间窗口的所述开始时间之前从所述传感器所接收的信号。

[0025] 根据本发明的一些实施例,所述预定时间段是至少30秒。

[0026] 根据本发明的一些实施例,所述方法还包括:从所述洗涤的所述开始就监测所述可检测的信号,并根据所述信号的一时间依赖性的一变化,识别所述时间窗口的所述开始。

[0027] 根据本发明的一些实施例,所述亲和性基包含一免疫原性部分。

[0028] 根据本发明的一些实施例,所述免疫原性部分包含一抗体或一抗体片段。

[0029] 根据本发明的一些实施例,所述亲和性部分包含一配体,并且所述标记物是包含一受体的一生物标记物。

[0030] 根据本发明的一些实施例,所述亲和部分包含一配体和一标记物,所述标记物包含一受体的一生物标志物。

[0031] 根据本发明的一些实施例,所述方法还包括:使所述液体与对所述标记物为非特异性的一传感器接触,并且还将所述液体从所述非特异性的传感器洗涤去,其中检测所述标记物的存在和/或浓度是根据所述可检测的信号与从所述非特异性的传感器所接收的一背景信号之间的比较。

[0032] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供一种用于检测一液体中一标记物的存在和/或浓度的系统。所述系统包括:一流体装置,具有一传感腔室与位于所述传感腔室中的一传感器,所述传感器具有一固定的亲和性部分,所述亲和性部分与所述标记物相互作用,并且所述传感器配置用以因应于所述相互作用产生一可检测的信号;一流量控制系统,用于将一洗涤缓冲液引入所述腔室,以将所述液体从所述传感器洗涤去;以及一信号分析器,用于在所述洗涤的一开始时间之后,于一预定时间段开始的一时间窗口内,分析根据从所述传感器所接收的一可检测的信号,以检测所述标记物的存在和/或浓度。

[0033] 根据本发明的一些实施例,所述相互作用以一 K_D 值为特征或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-5}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-6}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-7}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-8}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-9}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-10}M$ 。

[0034] 根据本发明的一些实施例,所述信号分析器配置用以丢弃在所述时间窗口的所述开始时间之前从所述传感器接收的所述分析信号。

[0035] 根据本发明的一些实施例,所述信号分析器被配置用以从所述洗涤的所述开始就监测所述可检测的信号,并根据所述信号的一时间依赖性的一变化,识别所述时间窗口的所述开始。

[0036] 根据本发明的一些实施例,所述时间窗口的所述开始是在所述信号的一变化率以绝对值而言低于一预定阈值的一时间点所定义。

[0037] 根据本发明的一些实施例,所述流体装置还包括一传感器,所述传感器对所述传

感腔室中所述标记物为非特异性,所述信号分析器配置用以比较所述可检测的信号与从所述非特异性的传感器所接收的一背景信号,以根据所述比较来检测所述标记物的存在和/或浓度。

[0038] 根据本发明的一些实施例,所述传感器是一纳米结构,并且所述亲和性部分固定在所述纳米结构的一表面上。

[0039] 根据本发明的一些实施例,所述传感器是一纳米结构,并且所述亲和性部分固定在所述纳米结构的一表面上。

[0040] 根据本发明的一些实施例,所述传感器是一晶体管。

[0041] 根据本发明的一些实施例,所述传感器是一晶体管,所述晶体管具有一纳米结构作为一通道,并且其中所述亲和性部分固定在所述纳米结构的一表面上。

[0042] 根据本发明的一些实施例,所述晶体管是一场效应晶体管。

附图说明

[0043] 发明的一些实施例在本文中仅以示例性的方式描述,并参考附图。现在具体详细地参照附图,重要的是其所显示的细节是通过示例的方式,用于说明及讨论本发明的实施例。在这点上,描述并结合附图使得本领域技术人员能够明了本发明的实施例如何被实施。

[0044] 在图式中:

[0045] 图1A至图1G是影像(图1A和图1B)和根据本发明的一些实施例中20nm直径P型硅纳米线材料场效应晶体管(SiNW-FET)装置的制造工艺(图1C至图1G)的示意图;

[0046] 图2是根据本发明的一些实施例中,用抗体修饰SiNW FET装置的方法的示意图;

[0047] 图3显示在引入含抗原的缓冲液时,通过将洗涤缓冲液引入含有多个SiNW FET的一流体系统之后,抗体修饰的SiNW FET的示例性反应校正曲线,如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中所获得;

[0048] 图4显示在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中所获得的生物样品中,抗体修饰的SiNW FET的校正过的反应;

[0049] 图5显示根据本发明的一些实施例中,存在图4的生物样品时的反应校正曲线,但是是在开始洗涤操作之后;

[0050] 图6显示在开始洗涤操作之后,在生物样品存在下可获得的两条反应校正曲线,如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0051] 图7是根据本发明的一些实施例中的一流程图,示意性地说明适于检测一生物液体中生物标记物的存在和/或浓度的方法。

[0052] 图8A和图8B是根据本发明的一些实施例中适于使用的多个传感器的多个示意图;

[0053] 图9是根据本发明的一些实施例中,用于检测一液体(例如生物液体)中一标记物(例如生物标记物)的存在和/或浓度的系统的一示意图。

[0054] 图10是根据本发明的一些实施例中的一示意图,描述从抗体修饰的SiNW FET传感装置检测一抗原的操作原理;

[0055] 图11显示一代表性抗CA 15-3固定的SiNW FET传感装置,对抗在未处理的血清样品中各种浓度的靶抗原CA 15-3的标准化结合反应,如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0056] 图12显示一代表性抗肌钙蛋白 (anti-troponin) 抗体修饰的SiNW FET传感装置, 在低离子强度条件下, 对其特异性抗原肌钙蛋白T的结合和解离的标准化电性反应, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0057] 图13显示缓慢流动条件下, 血清中的抗肌钙蛋白抗体 (anti-troponin antibody) 的解离曲线以及拟合, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0058] 图14A和图14B显示含肌钙蛋白T抗原的血清样品和对照组肌钙蛋白T无血清样品的解离动力学之间的比较结果, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0059] 图15显示缓慢流动条件下血清的解离曲线以及拟合, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0060] 图16显示缓慢流动条件下血清的抗CA 15-3抗体的解离曲线以及拟合, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0061] 图17A至图17D显示CA15-3抗原在未加工的血清样品中的浓度依赖性传感, 其流速为每分钟1腔室-体积交换, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0062] 图18显示CA15-3抗原于其抗体修饰的纳米线材装置的再生曲线, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0063] 图19A和图19B显示使用特异性和非特异性化学修饰的SiNW FET装置的CA 15-3抗原的多重单芯片分离检测 (multiplex single-chip differential detection), 其流速为每分钟330腔室-体积交换, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0064] 图20显示在快速流动条件下无抗原血清的解离曲线以及拟合, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0065] 图21显示缓慢流动条件下无抗原的未处理的血液的解离曲线以及拟合, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得;

[0066] 图22A和图22B显示在水闸配置下p型SiNW FET纳米装置的电特性, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得; 和

[0067] 图23A和图23B是SiNW的扫描电子显微镜 (SEM) 影像, 如在根据本发明的一些实施例所进行的实验期间中获得。

具体实施方式

[0068] 在本发明的一些实施例中, 本发明涉及传感, 并且更具体地但非排他地, 涉及用于检测标记物的方法和系统, 所述标记物例如但不限于液体中的生物标记物, 例如但不限于生物液体。

[0069] 在说细实明本发明的至少一种详施例之前, 应当理解的是, 本发明不只限于应用到下面的说明中所阐述的及/或图示中及/或示例中所的显示的多个构件及/或多个方法的建构及配置的细节。本发明能够实施成为其它的实施例或以各种方式被实践。

[0070] 本发明人设计一种传感系统和方法, 所述传感系统和方法可用于传感, 并且可选地并且优选地监测液体中标记物的存在, 更优选地监测其量。传感系统和方法可用于多种类型液体中多种类型标记物的多重实时监测。

[0071] 本实施例的传感系统可用于许多应用, 包括但不限于化学应用、遗传应用、生物化学应用、药物应用、生物医学应用、医学应用、放射学应用和环境应用。

[0072] 对于医学应用,本实施例的传感系统和方法适用于监测生物液体(例如生理溶液)中生物标记物的存在,更优选地为水平。

[0073] 对于环境应用,本实施例的传感系统和方法适用于监测标记物的存在,更优选地为标记物水平,其指示液体中有害物质的存在或水平,例如但不限于水污染物、化学试剂、生物有机体或水中的放射性条件。

[0074] 液体可以是一液体,包含血液产品,可以是全血或血液成分。例如,液体可以是一血液样品。液体可包含其他体液,包括但不限于唾液、脑脊髓液、尿液等。液体可以是缓冲液或溶液,例如但不限于核酸溶液、蛋白质溶液、肽溶液、抗体溶液等。还考虑了含有一或多种生物和化学试剂的液体,例如但不限于氧化剂、还原剂、酶、受体配体(receptor ligands)、细胞外组分、代谢物、脂肪酸、类固醇等。本实施例的系统和方法可以感测多种液体中的一标记物,所述多种液体的代表性液体列表,包括但不限于水、盐水、尿液、血液、精子、唾液、粘液、儿茶液、淋巴液、脑脊髓液、阴道分泌液、脓液、呕吐物、汗液和无机液体,包括但不限于石油液体、油或其他润滑剂。

[0075] 根据本发明的一些实施例中,将具有标记物(例如生物标记物)的液体(例如生物液体)引入流体系统,所述流体系统包括一传感器,所述传感器具有一固定的亲和性部分,所述亲和性部分与所述标记物相互作用,并且所述传感器配置用以因应于所述相互作用产生一可检测的信号。所述相互作用可选地且优选地,以一 K_D 值为特征或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-5}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-6}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-7}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-8}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-9}M$,或所述 K_D 值等于或小于 $10^{-10}M$ 。液体中的标记物选择性地与亲和性部分结合。背景组分可以包括任何类型的物体,例如但不限于盐和生物分子,可以非特异性地吸附到传感器的表面。

[0076] 在将标记物选择性吸附到传感器表面后,用洗涤缓冲液洗涤传感器。这导致背景成分从传感器表面解吸(desorption)。由于标记物和亲和性部分之间的相互作用强于背景成分与传感器表面的相互作用,因此背景成分比标记物更快地离开传感器表面。优选在所有或大部分背景组分被洗掉之后,检测来自传感器的标记物的解吸动力学。

[0077] 虽然下面的实施例特别强调生物液体中的生物标记物,但应理解其他类型的标记物和其他类型的液体也是可以预期的。

[0078] 本实施例的系统任选地且优选地在单一芯片上提供生物样品的直接分析。本实施例的系统可以选择性地检测特定的低丰度(abundant)生物标记物,同时去除不需要的成分(盐、生物分子、蛋白质、细胞等)。优选地,进行分析而不进行以下操作中的至少一种,或更优选地,不进行任何操作:离心、脱盐和亲和性柱(affinity columns),因为已知这些操作是耗时的。在本发明的一些实施例中,分析过程在少于15分钟或少于10分钟或少于5分钟内进行。

[0079] 在本发明的一些实施例中,还测量生物样品中生物标记物的量。例如,这可以通过提供一种系统来完成,其中一些传感器包括亲和性部分,而一些传感器不包括亲和性部分。来自不包括亲和性部分的传感器的解吸(desorption)被定义为背景。包含亲和性部分的传感器的生物标记物的解吸动力学,任选地且优选地与所述背景进行比较,并且根据所述比较,决定从包括亲和性部分的传感器解吸(desorpted)的生物标记物的量,例如通过相互减去信号。由于生物标记物于表面的特定吸收,与生物样品中生物标记物的浓度成比例,因此

高于背景的解吸动力学是浓度依赖性的。

[0080] 现在参考图7,其为一流程图,根据本发明的一些实施例中示意性说明一方法,其适合于检测液体(例如生物液体)中标记物(例如生物标记物)的存在和/或浓度。

[0081] 应该理解的是,除非另有定义,本文以下文描述的操作可以在许多执行组合或顺序同时或依序执行。具体而言,流程图的顺序不应被视为限制。例如出现在下面的描述中或以一特定顺序出现在流程图中的两个或更多个的操作可以以不同的顺序(例如相反的顺序)执行,或本质上同时执行。此外,以下描述的若干操作是可选择的,并且可以不执行的。

[0082] 所述方法从10开始,并且任选地并且优选地继续到11,其中液体与传感器接触。可以通过本领域已知的任何技术建立所述接触。优选但非必要地,传感器处于流体系统中,更优选地是微流体系统中,并且液体被引入流体系统中。

[0083] 图8A和图8B是适用于本实施例的传感器的示意图。图8A显示传感器20,其包括固定的亲和性部分48。在本实施例的技术中使用的传感器可以是在标记物或生物标记物的存在下提供一可检测信号的任何电位传感器。

[0084] 当传感器的电特性(电导率、电阻率、电容)因应于与标记物或生物标记物50的相互作用而变化时,通常产生一可检测信号。在一些实施例中,传感器是晶体管。在这些实施例中,部分48任选并优选地固定在晶体管沟道的表面上。

[0085] 根据一些实施例,传感器是纳米结构,并且亲和性部分固定在纳米结构的表面上。根据本发明的一些实施例,传感器是一晶体管,具有纳米结构作为沟道,其中亲和性部分固定在纳米结构的表面上。

[0086] 根据一些实施例,传感器是非纳米的结构。在这些实施例中,亲和性部分固定在所述结构的所有尺寸(长度、宽度和厚度)均在1000纳米以上,或大于10微米、或大于100微米、或大于1毫米。

[0087] 根据本发明的一些实施例,传感器是一晶体管,具有非纳米结构作为沟道,其中亲和性部分固定在纳米结构的表面上。

[0088] 根据本发明的一些实施例,所述晶体管是一场效应晶体管(FET)。

[0089] 当传感器包括晶体管(例如,FET)并且亲和部分固定在晶体管的沟道上时,沟道的电特性的变化可以引起晶体管对栅极电压的特性反应变化(例如作为栅极电压函数的源-漏电流),可以检测和分析所述变化。

[0090] 图8A显示一实施例,其中传感器20包括结构40,例如但不限于纳米结构,其中亲和性部分48固定在结构40的表面上。

[0091] 亲和性部分48有效地与液体或生物液体中的标记物或生物标记物50反应(例如结合)。

[0092] 传感器20被配置用以因应于亲和性部分48与标记物或生物标记物50的相互作用而产生一可检测信号,通常是电信号。

[0093] 如本文所用,术语“亲和性部分”是指以标记物或生物标记物以预定亲和性和优选特异性结合的分子。

[0094] 亲和性部分48和标记物或生物标记物50任选地且优选地是亲和性对(affinity pair)的成员,其中部分48能够可逆或不可逆地结合标记物或生物标记物50。部分48和标记物或生物标记物50之间的相互作用的特征在于亲和性通常弱于一共价键的特征亲和性,当

以 K_D 值表示时,通常对应于约 10^{-15} M的 K_D 值。在本发明的任何实施例中,部分48与标记物或生物标记物50之间的相互作用的特征在于亲和性优选地由等于或小于 10^{-5} 的 K_D 值或等于或小于 10^{-6} M的 K_D 值、或等于或小于 10^{-7} M的 K_D 值、或等于或小于 10^{-8} M的 K_D 值、或等于或小于 10^{-9} M的 K_D 值、或等于或小于 10^{-10} M的 K_D 值所定义。

[0095] 测量亲和性的方法是本领域公知的,包括表面等离子体共振(surface plasmon resonance)和竞争测定(competition assays)。

[0096] 亲和性部分可以是天然存在的或合成设计或生产的。

[0097] 亲和部分的实例包括抗体-抗原(免疫原性部分)、配体-受体(例如可溶性受体或膜结合的受体)、碳水化合物-凝集素(lectin)、RNA-适体(aptamer)、核酸序列互补等。

[0098] 根据本发明的一些实施例中,亲和性部分包括一免疫原性部分。根据本发明的一些实施例中,所述免疫原性部分包含一抗体或其一片段。根据本发明的一些实施例中,所述免疫原性部分包含一抗原。在这些实施例中,所述标记物是一生物标记物,其优选包含针对所述抗原的一抗体。根据本发明的一些实施例中,所述亲和性部分包含一配体。在这些实施例中,所述标记物优选地是包含一受体的一生物标记物。

[0099] 部分48可以通过本领域已知的任何技术附着到纳米结构40的表面,例如但不限于根据抗体捕获单元(antibody-capturing units)的片段化的技术并且在Elnathan等人,于纳米文献期刊中Nano Lett 2012,12,(10),5245-5254,其内容通过引用结合到本文中。

[0100] 通过部分48中的反应性基团与纳米结构40表面上的相容的反应性基团,可以直接或通过一连接物(linker)将部分48连接到纳米结构40的表面。优选地,所述连接是一共价连接。在多个示例性实施例中,所述连接物在纳米结构的表面上产生一反应性胺基团,其任选地经受还原胺化(reductive amination)以提供与部分48结合的醛末端(aldehyde-terminated)的表面。纳米结构40的表面上反应性基团可以是固有的或可以在处理时产生。

[0101] 纳米结构40优选是长形的。

[0102] 如本文所用,“长形纳米结构(elongated nanostructure)”通常是指由一固体物质制成的一个三维体,并且延其长度的任何一点处具有至少一横截面尺寸,并且在一些实施例中,具有两个横截面尺寸。正交横截面尺寸小于1微米、或小于500纳米、或小于200纳米、或小于150纳米、或小于100纳米、或甚至小于70纳米、小于50纳米、小于20纳米、小于10纳米、或小于5纳米。在一些实施例中,横截面尺寸可小于2纳米或1纳米。

[0103] 在一些实施例中,所述纳米结构具有至少一横截面尺寸,范围为0.5纳米至200纳米,或1纳米至100纳米,或1纳米至50纳米。

[0104] 一纳米结构的长度表示其延伸程度,通常垂直于其横截面。根据本发明的一些实施例,所述纳米结构的长度范围为10纳米至50微米。

[0105] 长形半导体的横截面可以具有任何形状,包括但不限于圆形、方形、矩形、椭圆形和管形。包括规则和不规则的形状。

[0106] 在本发明的各种示例性实施方案中,所述纳米结构是一非中空结构,在本文中称为“纳米线材(nanowire)”。

[0107] “线材(wire)”是指具有导电性的任何材料,即具有使电荷通过其自身的能力。

[0108] 在一些实施例中,所述纳米线材的平均直径为0.5纳米至200纳米,或1纳米至100

纳米,或1纳米至50纳米。

[0109] 在本发明的一些实施例中,所述纳米结构成形为一中空管,优选地沿其纵轴完全中空,在本文中称为“纳米管(nanotube)”或“纳米管状结构(nanotubular structure)”。

[0110] 所述纳米管可以是一单壁纳米管、多壁纳米管或其组合。

[0111] 在一些实施例中,所述纳米管的平均内径为0.5纳米至200纳米、或1纳米至100纳米、或1纳米至50纳米。

[0112] 在多壁纳米管的情况下,在一些实施例中,一壁间距离可以为0.5纳米至200纳米、或1纳米至100纳米、或1纳米至50纳米。

[0113] 应理解,尽管如此图8A显示一单一纳米结构40,一些实施例考量一配置,其中传感器20包括多个(即,两个或更多个)纳米结构。当采用多个纳米结构时,纳米结构40任选地并且优选地排列成一阵列。例如纳米结构可以大致彼此平行地配置,如图8B中示意性地显示。

[0114] 考虑到本文所提供的有益地实施本发明实施例的指导,本领域一般技术人员将明白并易于重现适于形成本文所述的纳米结构的多个半导体材料。例如,本发明实施例的纳米结构可以由第IV族元素的半导体制成,以及元素周期表第II、III、IV、V和VI族中任何一种、两种或多种元素的各种组合制成。

[0115] 如本文所用,术语“族(Group)”具有其通常的定义,如本领域普通技术人员所理解的。例如第III族元素包括硼(B)、铝(Al)、镓(Ga)、铟(In)和铊(Tl);第IV族元素包括碳(C)、硅(Si)、锗(Ge)、锡(Sn)和铅(Pb);第V族元素包括氮(N)、磷(P)、砷(As)、锑(Sb)和铋(Bi);和第VI族元素包括氧(O)、硫(S)、硒(Se)、碲(Te)和钋(Po)。

[0116] 在本发明的一些实施例中,所述纳米结构由掺杂有供体原子(donor element)的半导体材料所制成,称为“掺杂剂(dopant)”。本发明的实施例考量掺杂,以实现n型(比完成一晶格结构多的电子过量)和p型(比完成一晶格结构少的电子不足)掺杂。n型材料中的额外电子或留在p型材料中的空穴(电子的不足)分别用作为负电荷载流子(negative charge carriers)和正电荷载流子(positive charge carriers)。适合作为p型掺杂剂和n型掺杂剂的供体原子在本领域中是已知的。

[0117] 例如,所述纳米结构可以由掺杂有硼(B)(通常是乙硼烷(Diborane),但并非一定)、铝(Al)或镓(Ga)的硅所制成,以提供一p型半导体纳米结构,或具有磷(P)(通常是膦(phosphine),但并非一定)、砷(As)、锑(Sb)或提供一n型半导体纳米结构。

[0118] 在本发明人进行的实验中,已经使用了具有乙硼烷掺杂剂的Si纳米线材和p型Si纳米线材。

[0119] 在本发明的一些实施例中,纳米结构由一导电材料制成或包含导电材料(例如碳)。例如纳米结构可以是碳纳米管,单壁纳米管(single-walled nanotubes,SWNT)可以被认为是多层长包裹的石墨烯片(long wrapped graphene sheets),或者是多壁纳米管(multi walled nanotubes,MWNT),其可以被认为是具有不同直径的同心SWNT的集合。SWNT的典型直径为小于几纳米的量级,并且MWNT的典型直径为几十纳米到几百纳米的量级。

[0120] 当采用多个纳米结构时,可以使用例如化学气相沉积来生长纳米结构。或者,可以使用激光辅助催化生长(laser assisted catalytic growth,LCG)制造纳米线材。用于形成半导体纳米结构和构建如本文所述的多个纳米结构阵列的任何方法都是可预期的。当采用多个纳米结构40时,在每个纳米结构上固定有亲和部分48。在本发明的一些实施例中,所

有的亲和部分在所有纳米结构中是相同的,并且在一些实施例中,至少两个纳米结构连接到不同的亲和性部分。

[0121] 标记物或生物标记物50与部分48之间的反应事件改变纳米结构40的表面电位,因此导致纳米结构40的电性质的变化。例如,纳米结构40可表现出电子或空穴密度的变化,在纳米结构40的一些区域上或在整个纳米结构40的长度上。纳米结构40可以额外地或替代地表现出其导电性或电阻率的变化。

[0122] 再次参考图7,所述方法任选地并且优选地进行到12,其中液体或生物液体从所述传感器洗涤去,并且到13,其中根据在所述洗涤12的一开始时间之后于一预定时间段(例如至少10秒、或至少20秒、或至少30秒、或至少45秒、或至少60秒、或至少75秒、或至少90秒、或至少105秒、或至少120秒、或至少135秒或至少150秒)。优选地,检测是根据在时间窗口内接收的信号,但不是根据从时间窗口的开始时间之前从所述传感器所接收的信号。所述时间窗口的持续时间优选为约30秒至约500秒。还考虑了其他多个预定时间段和多个时间窗口期间,其包括在上述范围之外的多个预定时间段和多个时间窗口期间。

[0123] 根据本发明的一些实施例中,从洗涤开始,更优选地从洗涤开始之前或之后立即监测信号,但是在时间窗口的开始不是在洗涤的开始,标记物的存在或水平是根据在所述时间窗口期间内所述信号。在这些实施例中,所述方法可选地并且优选地从信号本身决定所述时间窗口的开始。例如,这可以通过监视信号的时间依赖性(例如某些导数(derivative)相对于时间的斜率、平台期、归零,某些导数相对于时间的值等)以及根据时间依赖性的变化,识别时间窗口的开始来完成。例如,所述方法可以将时间窗口的开始识别为信号表现出减小的时间点,或者信号离开一平台区域的时间点。

[0124] 任选地并且优选地通过使用一电极布置,监测纳米结构40的电特性变化来进行检测。参考图8A和图8B,在本发明的一些实施例中,传感器20包括源极42和漏极44,其中纳米结构40设置在电极42和44之间并用作电荷载流子通道(charge carrier channel)。可选地,传感器20还包括栅极46,与电极42和44以及纳米结构40一同形成一晶体管,例如场效应晶体管(FET)。栅极46可选地且优选地但不是必须地通过一间隙47与纳米结构40间隔开。栅电压可以通过栅极46施加到沟道纳米结构40。在一些实施例中,当栅极46的电压为零时,纳米结构40不含任何自由载流子,并且基本上是绝缘体。随着栅电压增加,引起的电场从源极42和漏极44吸引电子(或更一般地,电荷载流子),并且纳米结构40变得导电。在一些实施例中,没有施加栅极电压,并且电荷载流子密度的变化仅通过亲和性部分48和标记物或生物标记物50之间的相互作用来实现。

[0125] 传感器20的电极可以直接或间接连接到电路(未显示)。所述电路可以通过一或多个电极向纳米结构40施加电压,并且因应于标记物或生物标记物50与亲和性部分48的结合,监测纳米结构40的电特性的变化。所述电路例如可以构造用以测量对应于纳米结构40的电特性变化的电测量。所述电测量例如可以是电压、电流、电导率(conductivity)、电阻(resistance)、阻抗(impedance)、电感(inductance)、电荷(charge)等。

[0126] 所述方法任选地并且优选地继续到14,其中液体或生物液体与另一传感器接触,所述传感器优选地对标记物或生物标记物50是非特异性的。在这些实施例中,所述方法任选且优选地继续到15,其中液体或生物液体也从非特异性传感器洗涤去。当执行操作14和15时,标记物或生物标记物的存在和/或浓度的检测,可选地且优选地是根据一可检测信号

与从非特定传感器所接收的一背景信号之间的比较16。根据所数比较的检测通常在17显示。

[0127] 所述方法在18结束。

[0128] 图9是根据本发明的一些实施例中,用于检测液体或生物液体92中的标记物或生物标记物50(未显示)的存在和/或浓度的系统90的示意图。系统90可用于执行方法10的一或多个操作,更优选地所有操作。系统90可包括流体装置94,其具有一传感腔室96和一传感器,例如但不限于传感器20于所述传感腔室96。系统90可以任选地并且优选地包括流量控制系统98,用于将洗涤缓冲液100引入腔室96,以从传感器20将液体或生物液体92洗涤去,以及包括一信号分析器102,其具有用于分析的一电路104。从传感器20接收的一可检测信号,如上文进一步详细描述。

[0129] 在本发明的一些实施例中,流体装置94包括一非特异性传感器106,其对标记物或生物标记物为非特异性,如上文进一步详述的。传感器106可以与传感器20在同一传感腔室96中。在这些实施例中,一信号分析器104的电路102可以在可检测信号和背景信号之间进行比较,并检测标记物的存在和/或浓度。根据所述比较的标记物或生物标记物,如上文进一步详述的。

[0130] 如本文所用的术语“约”是指 $\pm 10\%$,并且符号“ \approx ”表示具有至多10%的公差的相等性。

[0131] 术语“包括(comprises)”、“包括(comprising)”、“包括(includes)”、“包含(including)”、“具有(having)”及其词形变化是指“包括但不限于”。

[0132] 术语“由...组成(consisting of)”意指“包括并且限于”。

[0133] 术语“本质上由.....组成(consisting essentially of)”指的是组成或方法可包括额外的成分和/或步骤,但仅当额外的成分和/或步骤不实质上改变所要求保护的组成或方法的基本和新颖特性。

[0134] 本文所使用的单数形式“一”、“一个”及“至少一”包括复数引用,除非上下文另有明确规定。例如,术语“一化合物”或“至少一种化合物”可以包括多个化合物,包括其混合物。

[0135] 以下介绍了本实施例的方法优于其他技术的一些优点:

[0136] 从femtoMolar到nanoMolar范围的灵敏度(样品中的生物标记物浓度);

[0137] 在不到5分钟的时间内快速获得结果;

[0138] 实时(real-time)超灵敏监测;

[0139] 快速且缺乏耗时的过程(即离心、透析、亲和性管柱);

[0140] 无标签:减少担心的步骤、不需要激活(excite)和成像;

[0141] 多重(Multiplex):尽可能多地提取生物数据;

[0142] 克服Debye筛选长度;

[0143] 易于与芯片实验室系统集成;

[0144] 使用体积非常小的样品;

[0145] 可重复使用/可逆;

[0146] 低成本。

[0147] 在整个本申请中,本发明的各种实施例可以以一个范围的形式存在。应当理解,以

一范围形式的描述仅仅是因为方便及简洁,不应理解为对本发明范围的硬性限制。因此,应当认为所述的范围描述已经具体公开所有可能的子范围以及所述范围内的单一数值。例如,应当认为从1到6的范围描述已经具体公开子范围,例如从1到3,从1到4,从1到5,从2到4,从2到6,从3到6等,以及所数范围内的单一数字,例如1、2、3、4、5及6,此不管范围为何皆适用。

[0148] 每当在本文中指出数值范围,是指包括所指范围内的任何引用的数字(分数或整数)。术语,“第一指示数字及第二指示数字”之间的范围”及“第一指示数字”到”第二指示数字”的范围”在本文中可互换,并指包括第一及第二指示数字,及其间的所有分数及整数。

[0149] 除非另有定义,否则所有本文使用的技术和/或科学术语与本发明所属领域的通常技术人员所理解的具有相同含义。尽管与本文所描述的类似或相同的方法或材料可以用于实践或测试本发明的实施例,但是仍将示例性的方法和/或材料描述如下。在冲突的情况下,以专利说明书所包含的定义为主。此外材料、方法和实施例仅是用于说明,而非旨在必然性地限制各自实施例。

[0150] 本发明实施例的方法和/或系统的实现可以涉及手动地或自动地执行或完成所选择的任务或其组合。此外,根据本发明实施例的方法和/或系统的实际仪器和设备,若干所选择的任务可以通过硬件、软件或固件或其组合使用一操作系统来实现。

[0151] 例如,根据本发明的实施例用于执行所选择的任务的硬件可以被实现为芯片或电路。至于软件,根据本发明的实施例所选择的任务可实施为多个软件指令,使用任何合适的作业系统通过一电脑执行。在本发明的一示例性实施例中,根据如本文所述的系统和/或方法的示范性实施例的一或多个任务通过一数据处理器执行,诸如用于执行多个指令的一计算平台。可选地,数据处理器包括用于存储指令和/或数据的一易失性存储器(volatile storage)和/或用于存储指令和/或数据的非易失性存储器(non-volatile storage),例如磁性硬盘和/或可移除的介质。

[0152] 任选地,设置一网络连接。可选地设置显示器和/或使用用户输入装置,诸如键盘或鼠标。

[0153] 可以理解,本发明中的特定特征,为清楚起见,在分开的实施例的内文中描述,也可以在单一实施例的组合中提供。相反地,本发明中,为简洁起见,在单一实施例的内文中所描述的各种特征,也可以分开地、或者以任何合适的子组合、或者在适用于本发明的任何其他描述的实施例中提供。在各种实施例的内文中所描述的特定特征,并不被认为是那些实施方案的必要特征,除非所述实施例没有那些元素就不起作用。

[0154] 上文所述的及以权利要求项部分所请求的本发明各种实施例和方面,可在以下的实施例中找到实验支持。

[0155] 示例:

[0156] 现在参考以下实施例,其与以上描述一起以非限制性方式说明本发明的一些实施例。

[0157] 示例1

[0158] 硅纳米线材场效应晶体管(SiNW-FET)的制造:

[0159] 图1A至图1G是图像(图1A和图1B)和根据本发明的一些实施例中在具有600纳米氧化物层的3英寸硅晶片上装配20纳米直径P型硅纳米线材(SiNW)FET装置的制造工艺(图1C

至图1G)的示意图。

[0160] 通过化学气相沉积(chemical vapor deposition,CVD)系统(通过汽液固体(vapor liquid solid,VLS)工艺)合成P型SiNW(图1C)。将p型SiNW沉积在具有600纳米的氧化物层和外部金属焊盘(5纳米铬Cr,然后60纳米金Au)的硅衬底上,其通过光刻预先制造(图1D)。使用由500纳米LOR5A(Microchem)和500纳米1805(Shipley)所组成的多层光阻结构,沉积源极和漏极。在电极图案的曝光和显影之后(图1E),分别通过电子束和镍(60纳米)的热蒸发使触点金属化,然后用Si₃N₄(60纳米厚)的绝缘层钝化,在80℃下,以等离子体增强化学气相沉积(plasma-enhanced chemical vapor deposition,ICP-PECVD,Axic Inc.)和10纳米氧化铝层(使用Cambridge Nanotech Savannah 200系统的ALD沉积)进行沉积所述绝缘层(图1F)。执行未曝光的光阻层的剥离以及SiNW和金属触点的热退火(图1G)。每个FET的源极和漏极之间的间隔约为2微米。

[0161] 示例2

[0162] 用抗体修饰的SiNW的制备:

[0163] 图2中示意性地显示具有抗体的硅纳米线材(SiNW)FET装置的修饰。所述过程简要描述如下:

[0164] 表面清洁和活化:用丙酮、去离子水和异丙醇洗涤如本文实施例1中所述而制备的SiNW FET;在N₂流下干燥;然后将表面活化,以用氧等离子体(0.200托、100瓦、10分钟)进行硅烷化(silanization)。

[0165] 硅烷化(silanization):装置表面覆盖有(3-氨基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷((3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane)并加热至50℃并保持60分钟。然后用异丙醇洗涤表面,然后在热板上脱水(115℃、30分钟)。

[0166] 交联剂结合:装置被含有12毫摩尔浓度氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride)的8.3%戊二醛(glutaraldehyde)于磷酸盐缓冲液中10毫摩尔浓度,pH=8.5(60分钟,室温)中覆盖。此后,用去离子水、丙酮、异丙醇和再次用去离子水洗涤装置。

[0167] 芯片上的通道组合件:用异丙醇和去离子水洗涤管道和PDMS通道。然后将管连接到一注射泵,并通过引入磷酸盐缓冲液(PB)(10毫摩尔浓度,pH=8.5)洗涤系统。

[0168] 抗体固定:将CA 15-3IgG(40微升,1毫克/毫升)与含有12毫摩尔浓度的氰基硼氢化钠的700微升的磷酸盐缓冲液(10毫摩尔浓度,pH=8.5)温和混合。将抗体溶液引入系统(4℃,过夜约16小时),然后用磷酸盐缓冲液(10毫摩尔浓度,pH=8.5)洗涤管系统,同时保持通道下的表面始终湿润。

[0169] 阻塞(blocking):在室温下以50微升/分钟的流速将含有乙醇胺(100毫摩尔浓度)和12毫摩尔浓度的氰基硼氢化钠的磷酸盐缓冲液(pH=8.5)的阻塞溶液引入系统3小时。然后用磷酸盐缓冲液(10毫摩尔浓度,pH=8.5)以50微升/分钟的流速洗涤所述系统30分钟。准备好的系统使用于传感。

[0170] 示例3

[0171] 传感:

[0172] 使用含抗原的缓冲液、洗涤缓冲液和生物样品,以实验研究含有如上文实施例2中所述的多个SiNW FET的流体系统。在所述实施例中,用抗肌钙蛋白T(anti-troponin T, Fab2片段)来修饰SiNW FET。

[0173] 含有抗原的缓冲液包括抗原心肌肌钙蛋白T(antigen cardiac troponin T,10纳摩尔浓度)。洗涤缓冲液包含150微摩尔浓度的磷酸盐缓冲液。

[0174] 图3显示在引入含抗原的缓冲液时,通过将洗涤缓冲液引入含有多个SiNW FET的一流体系统之后,抗体修饰的SiNW FET的示例性反应校正曲线。

[0175] 图3中的箭头A表示含抗原缓冲液被引入流体系统的时间点。此时,由于与抗体的相互作用,抗原被吸收在SiNW表面上,并且检测到电性反应的变化。图3中的箭头B表示将洗涤缓冲液引入流体系统的时间点。此时,大部分结合的抗原从SiNW解吸(desorption),并且检测到电性反应的反向变化。用于FET的参数是 $V_g=0$ 伏特, $V_{ds}=0.1$ 伏特。流体系统中由Mitos泵所产生的流速为20微升/分钟。

[0176] 图4显示抗体修饰的SiNW FET在生物样品中的校正过的反应。在所述实验中,生物样品是胎牛血清。图4中的箭头A表示将生物样品引入系统的时间点。用于FET的参数是 $V_g=0$ 伏特、 $V_{ds}=0.2$ 伏特。流体系统中的流速为100微升/分钟。

[0177] 图5显示开始洗涤操作后存在图4的生物样品时的一反应校正曲线。图5中的箭头B表示将洗涤缓冲液引入系统的时间点。用于FET的参数和流速与图4中的相同。浓度小于30单位/毫升的CA 15-3产生可检测的电性反应变化。

[0178] 图6显示在洗涤操作开始后在生物样品存在下可获得的两条反应校正曲线。图6中的箭头B表示将洗涤缓冲液引入系统的时间点。第一反应校正曲线对应于具有亲和性部分的传感器对生物标记物的解吸,并且第二校正曲线对应于没有亲和部分的传感器对生物标记物的解吸。第二校正曲线可以定义为可与第一曲线进行比较的背景。

[0179] 示例4

[0180] 详细研究:

[0181] 这个示例证明抗原解离区段(regime)的应用,来自抗体修饰的硅纳米线材传感器,作为复杂生物样品中目标生物标记物的简单而有效的直接传感机制,如血清和未经处理的血液,不需要非原位(ex situ)耗时的生物样品操作步骤,例如离心、过滤、预浓缩和脱盐,因此克服根据纳米线材的生物传感器的有缺陷的德拜(Debye)筛选限制。

[0182] 流体输送装置由柔性聚二甲基硅氧烷(flexible polydimethylsiloxane,PDMS)弹性体制成。将PDMS与固化剂以10:1的质量比在60°C下孵育过夜。然后将所得的装置切成矩形块,尺寸为10×10×5毫米。在这项研究中使用了两个不同尺寸的通道:一较大尺寸的矩形腔室(高=5毫米、长=7毫米和宽=3毫米),以及一矩形的小腔室(高=0.1毫米、长=3.5毫米、宽=1毫米)。上游聚乙烯管(polyethylene,PE 20,Intramedic)长14厘米、内径0.38毫米。下游Tygon管(S-50-HL,Tygon)长13厘米。

[0183] 对具有SiNW FET阵列的芯片进行化学修饰,以通过固定的抗体在SiNW FET表面上进行抗原的结合和解除结合的动力学的传感。为了将抗体与SiNWs表面缀合(conjugate),首先用丙酮(acetone,9005-68,JTBaker),异丙醇(isopropanol,9079-05,JTBaker)和去离子水(deionized water,18M Ω)依序洗涤FET芯片。接着,进行氮气干燥。然后,施加氧等离子体(oxygen plasma,100瓦(W),0.2托(Torr))15分钟。将芯片用玻璃皿覆盖并在氩气下(无水和无氧)插入手套箱(150B-G,Mbraun)中以进行氨基硅烷修饰(amino-silane modification)。紧接着,用约150微升的(3-氨基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷((3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane,APDMES;SIA0603.0,Gelest)覆盖芯片60分钟。然

后,用约30毫升的无水甲苯(244511,Sigma-Aldrich)洗涤芯片两次。将芯片从手套箱转移到洁净室并再次用异丙醇洗涤,然后氮气干燥。接下来,将芯片置于115°C的热板上30分钟。通过用8.3%戊二醛溶液(glutaraldehyde solution),在室温下覆盖所述装置持续60分钟,以执行随后的交联剂结合,其中所述戊二醛溶液含有12毫摩尔浓度的氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride)于10%磷酸盐缓冲液(pH=8.5)中,然后用去离子水、丙酮洗涤、异丙醇和去离子水洗涤。

[0184] 然后通过将所述管道连接到注射泵,将被异丙醇和去离子水预洗涤的PDMS通道组装到芯片上,然后抽取10毫摩尔浓度磷酸盐缓冲液(pH=8.5)。通过将含有10至100微克/毫升的IgG抗体,12毫摩尔浓度的氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride)和10毫摩尔浓度的磷酸盐缓冲液(pH=8.5)的抗体溶液抽取进入所述系统,在4°C下过夜(约16小时),将抗体固定在SiNW表面上。通过将含有100毫摩尔浓度的乙醇胺(ethanolamine)和12毫摩尔浓度的氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride)的阻塞溶液(blocking solution,pH=8.5)在10毫摩尔浓度的磷酸盐缓冲液(pH=8.5)中以50微升/分钟的流速在室温下取出进入所述系统150分钟,以进行阻塞步骤(blocking),然后用10毫摩尔浓度的磷酸盐缓冲液(pH=8.5)以50微升/分钟的流速洗涤30分钟。

[0185] 所述装置采用引线键合(使用引线键合机,型号8850,West Bond),传感器装置芯片与客制的PDMS微流体通道集成在一起。数据采集系统用于测量由表面电荷改变引起的SiNW FET(Ids)的电流。检测所选择的装置在传感缓冲液中的性能。栅电压扫描用于跨导测量(transconductance measurements),并随后确定晶体管的操作方式。进一步选择合适的栅电压以执行所有以下传感实验。通过一注射泵(Fusion 200,Chemyx)并经过微流体系统,将分析物引入传感芯片的期间,监测SiNW装置随时间的电导(以1秒间隔记录电流-时间信号),以进行传感实验。

[0186] 图22A和图22B显在水闸配置下p型SiNW FET纳米装置的电特性。图22A是在不同栅电压(Vg)下源-漏电流与源-漏电压(Vsd)的曲线图。图22B是在0.1V源-漏电压(Vg)下源-漏电流与栅电压(Vg)的曲线图。

[0187] 图23A和图23B是SiNW的扫描电子显微镜(SEM)影像。图23A是通过硅(100)晶圆上的化学气相沉积系统所合成的20纳米p型SiNW的SEM图像。图23B是SiNW FET装置的SEM图像,其由连接到源极和漏极的SiNW组成。

[0188] 发现在生物样品中控制执行定量生物标记分析的能力的参数包括(i)抗体-抗原识别对的亲和性强度(k_{off} 率),其决定高亲和性慢速离解的子区段的时间长度,以及(ii)在溶液交换解离步骤期间所施用的流速,其控制低亲和性快速解离的子区段的时间宽度。没有非原位(ex situ)生物样品操作的耗时过程而增强了传感平台的便携性,并将测试样品的所需体积减少到最小,因为其允许直接检测未经处理的生物样品(5至10微升的血液或血清),同时轻易地将检测周期时间缩短到不到5分钟,这是近期单点照护医疗应用中非常重要的因素。

[0189] 从其特异性抗体修饰的SiNW FET装置分析抗原的解离区段被证明对于复杂生物样品中敏感、选择性和直接检测多个生物标记物,是有效且直接的方法。

[0190] 将含有被分析的生物标记物的生物样品引入SiNW FET传感纳米装置。用抗体修饰的SiNW表面与被分析的生物标记物特异性地相互作用。作为抗体-抗原相互作用的结果,生

物标记物分子强烈且选择性地结合附着于纳米线材FET装置表面的抗体单元。在诸如血清或血液的生理溶液中,可能难以辨别生物标记物分析物的特异性结合,不是直接来自背景信号变化,这是由于高浓度带电化学物质所引起的电荷屏蔽,例如盐分和蛋白质。

[0191] 在生物标记物分子选择性结合后,用低离子强度的受控制的溶液(即传感缓冲液)快速冲洗装置,其中SiNW FET装置可有效地感测纳米线材上表面电荷的变化,由于强烈结合的抗原物质,没有未结合的非特异性化学物质的掩蔽效应。用传感缓冲液快速清洗传感装置,可以从纳米线材表面附近快速去除未结合的或松散结合的非特异性化学物质(盐,蛋白质,细胞,小分子),只留下特定的抗原分子,通过与纳米线材表面的强烈和特异性相互作用附着,显示出相当慢的解离动力学。

[0192] 这种效应有效地将“解离区段窗口”分成两个子区域:(i)在开始时,当低离子强度“传感缓冲液”被灌注到SiNWs FET传感阵列时,低亲和性实体(盐、生物分子、蛋白质等)迅速离开SiNW表面,这导致装置的导电性的快速变化。(ii)在移除低亲和性实体结束(非特异性解离子区段)之后,高亲和性实体的特异性解离(特异性解吸子区段)支配装置的电导率的变化。非特异性和特异性解离子区段之间的转换点最终应用于生物标记物蛋白的灵敏和准确检测。

[0193] 这种方法代表在单一平台上对复杂生物样品的直接分析,能够选择性地检测低浓度的特异性生物标记物,同时轻松去除不需要的化学物质(盐、生物分子、蛋白质、细胞),而无需耗费时间离、脱盐或亲和性管柱等步骤。整个超敏感蛋白质无标记分析过程实际上可以快速进行,例如在不到5分钟内完成。

[0194] 图10示意性地描述根据本发明的一些实施例中,来自抗体修饰的SiNW FET传感装置的抗原解离区段检测的操作原理。最初,将固定的SiNW装置引入低离子强度传感缓冲液中,以达到稳定的基线。接下来,将生物样品引入用特异性抗体修饰的SiNW FET装置,或引入用非免疫活性蛋白修饰的SiNW FET装置,图10的第(1)部分。

[0195] SiNW FET装置与分析样品中的生物分子的相互作用改变了所述结合区段窗口期间中装置的导电性,图10的第(2)部分。此时,由于高离子强度溶液中的电荷屏蔽效应, SiNW FET装置不能区分由特定抗原或其他生物分子与样品中的盐结合所引起的电导率变化。当SiNW FET装置被引回到低离子强度传感缓冲液时,通过快速冲洗传感室,来自生物样品的未结合的生物分子和盐,以依赖于其之间相互作用力量的方式,从SiNW FET装置的表面移除。

[0196] 在用抗体修饰的SiNW FET装置的情况下,由于抗原从其特异性抗体的解吸动力学(desorption kinetics)慢得多,特异性抗原的存在将降低返回基线的速率,图10的第(3)部分。然而,当用非特异性抗体所修饰的SiNW表面时,或当样品中没有抗原时,由于不存在特异性高亲和性的相互作用,返回基线的速率相当快。

[0197] 图11显示一代表性抗CA 15-3固定的SiNW FET传感装置,对抗在未处理的血清样品中各种浓度的靶抗原CA 15-3的标准化结合反应。黑色曲线表示FET装置对无CA 15-3的胎牛血清对照样品的反应。红色、蓝色和绿色曲线分别代表FET传感装置对未处理的胎牛血清中含有55、135和535皮摩尔浓度的CA 15-3抗原的样品的反应。黑色箭头描绘了在注射生物样品之前通过微流体通道在低离子强度传感缓冲液(传感缓冲液-SB,155微摩尔浓度磷酸钠缓冲液,pH=8.0)的流动下的传感装置电性基线。蓝色箭头表示未处理的血清生物样

品(高离子强度样品)的注射时间。可以在这些条件下从结合曲线中提取非分析的传感信息。图11的插图显示相同传感装置针对含有不同浓度的CA 15-3靶抗原的生物样品的相互作用的原始数据曲线。

[0198] 德拜(Debye)长度限制可预测纳米FET装置将不能在高离子强度生理条件下(德拜长度约为1纳米)传感抗原-抗体高亲和性相互作用。因此,测量的抗原结合曲线不能转化为分析信号(参见图11)。在血清样品中获得的结合曲线表明单株抗体修饰的纳米线材装置与各种浓度的CA 15-3抗原(人类癌症相关抗原)的标准化的电性反应之间的高度相似性,从0到535皮摩尔浓度,其为一种用于乳腺癌的诊断和监测的生物标记物。由于生物样品的高离子强度,未观察到SiNW FET传感装置与未处理的血清样品中不同浓度的被测试CA 15-3抗原的相互作用的分析差异,因此阻止了使用结合区段曲线作为实时检测生物分子物质的分析手段。因此,这些结果显示了开发新型基于纳米FET的检测方法的强烈需求,所述方法用于在未处理的生物样品溶液(例如血液)中直接检测蛋白质生物标记物。

[0199] 图12显示一代表性抗肌钙蛋白(anti-troponin)抗体修饰的SiNW FET传感装置,在低离子强度条件下(传感缓冲液SB,155微摩尔浓度的磷酸钠缓冲液,pH约为8.0)(红色曲线),对其特异性抗原肌钙蛋白T(specific antigen troponin T,cTnT,1纳摩尔浓度)的结合和解离的一标准化电性反应。还显示(黑色曲线)是一代表性抗肌钙蛋白(anti-troponin)抗体修饰的SiNW FET传感装置,在低离子强度条件下(传感缓冲液SB,155微摩尔浓度的磷酸钠缓冲液,pH约为8.0),对含BSA的样品(牛血清白蛋白,1纳摩尔浓度)的一标准化电性反应。黑色箭头描绘在注射相应样品之前,通过微流体通道在低离子强度传感缓冲液(传感缓冲液SB,155微摩尔浓度的磷酸钠缓冲液,pH约为8.0)下流动的传感装置电性基线。蓝色箭头表示将心肌肌钙蛋白T(抗原,用红线标记)或牛血清白蛋白(血清蛋白,用黑线标记)样品引入SiNW FET装置的时间(结合步骤)。绿色箭头表示随后用传感缓冲液洗涤的步骤(解离步骤)。

[0200] 在本实施例说明的具体病例中,心肌肌钙蛋白T(一种非常重要的心衰竭标记物)作为一抗原,而针对心肌肌钙蛋白T(cTnT)的抗原结合单株抗体被作为特异性抗体受体,其固定到SiNW FET表面。最初,将SiNW FET装置暴露于传感缓冲溶液SB,并且根据公式1对装置的电性反应进行标准化。如下:

[0201] $100\% \times (I_{SB} - I_t) / I_{SB}$. (公式1)

[0202] 其中 I_{SB} 是传感缓冲液(SB)中的电流,它是测量期间某个时间点的电流。

[0203] 接下来,将包含传感缓冲液中的心肌肌钙蛋白T抗原的样品引入检测通道(图12中用蓝色箭头表示),导致纳米装置表面附近的游离肌钙蛋白分子浓度急剧增加,接着肌钙蛋白分子与表面固定的抗体单元的逐渐高亲和性结合。结果,装置的标准化的电性反应增加,直到达到饱和点或平台期,表示肌钙蛋白抗原结合到纳米装置表面的最大量。接下来,用低离子强度传感缓冲液快速冲洗传感纳米装置。结合肌钙蛋白分子的量于反应上逐渐降低,直至达到原始传感缓冲液基线电信号。值得注意的是,观察到的肌钙蛋白抗原的解离动力学比其结合动力学慢得多。这些观察结果与被固定的抗体受体单元和抗原分子之间预期的高亲和性相互作用一致。

[0204] 当将抗cTnT抗体受体单元修饰的SiNW FET装置暴露于含有高浓度蛋白质BSA(牛血清白蛋白)的低离子强度溶液时,未观察到相应装置的电导率的显著变化。这些研究结果

表明,蛋白质分子与抗体修饰的基于SiNW的传感装置的结合,受特定的高亲和性抗原-抗体相互作用的支配,并且纳米线材的表面化学阻止了除了特异性靶抗原分子以外的生物分子的非特异性结合。在低离子强度条件下,获得的抗原结合曲线允许提取抗原分子结合到达平台期的饱和时间。为了一致性目的,在抗原结合达到平台期后实现所有进一步的解离实验数据。

[0205] 通过使用低离子强度传感缓冲液进行抗体修饰的SiNW装置的快速冲洗步骤,在达到特定抗原分子的完全结合后,所述装置能够分析地将解离区段时间窗口分成两个离散的解离子区域:(i)与低亲和性相互作用的化学实体(例如盐、非特异性蛋白质、细胞和小化学物质)相关的快速解离动力学子区域,和(ii)与高亲和性相互作用的化学实体(例如特异性抗原)相关的慢速解离动力学子区域。

[0206] 换句话说,使用低离子强度传感缓冲液的冲洗操作,以同时从纳米线材表面附近快速去除低亲和性快速解离的未结合或松散结合的非特异性分子,从而在完全去除低亲和性物质后,将这些带电物质引起的电荷屏蔽效应最小化,伴随着获得测量高亲和性慢速解离结合抗原物质的存在的能力。与慢速解离物质的解离速率相比,快速解离物质的解离动力学速率相当明显, $k_{\text{off}}^{\text{antigen}} \gg k_{\text{off}}^{\text{nonspecific}}$,使得实验性地将解离窗口区段分成上述子区段。因此可以选择所选表面附着抗体的固有亲和常数,以及SB冲洗步骤期间施加的流速,以根据解离区段窗口进行抗原种类的精确定量检测。

[0207] 在本发明的各种示例性实施例中,使用SB溶液的快速离子强度交换步骤不会显著影响特异性结合的抗原物质的量。例如,这可以通过选择时间窗口来确保,使得抗原-抗体对解离时间比时间窗口长得多,以完全去除未结合的和弱结合的非特异性物质(非特异性解离子区段)。通过在解离区段窗口期间增加冲洗SB溶液的流速,可以控制和缩短非特异性物质解离时间窗口。

[0208] 在两种模型抗体系统中,其特征在于高度不相似的亲和/解离常数,抗原解离区段窗口被测试为复杂生物样品中生物标记物质的定量检测的一潜在手段。首先,使用抗肌钙蛋白抗体片段以测试我们的假设,其代表整个野生型抗体分子的结构修饰片段,具有比原始完整抗体更低的抗原结合亲和性。结果如图13中所示,其显示在缓慢流动条件下血清中的抗肌钙蛋白抗体解离曲线以及拟合。从在低离子强度SB下所测量的抗原解离曲线中提取抗肌钙蛋白抗体片段的解离速率,解离速率 k_{off} ,并估计 $k_{\text{off}} = 1.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 。

[0209] 图14A和图14B显示来自固定(F(ab')₂)的SiNW FET装置的含肌钙蛋白T抗原的血清样品(肌钙蛋白浓度为10纳摩尔浓度)和对照不含肌钙蛋白T的血清样品的解离动力学的比较结果。测量如下进行。首先将样品(含有肌钙蛋白T的血清或不含肌钙蛋白T的血清对照样品)通过微流体通道引入固定的SiNW FET装置,流速为100微升/分钟(每分钟1腔室容积交换,腔室容积微100微升)直到达到结合平台期。接下来,用低离子强度传感缓冲液洗涤固定的SiNW FET装置。得到的解离动力学曲线表明,对于含有肌钙蛋白T的血清样品和不含肌钙蛋白的对照样品,标准化的电性反应具有一相似的时间变化(图14A和图14B,红色和黑色曲线)。纳米FET装置显示相对快速回归至基线电性反应(在低离子强度传感缓冲液下)和类似的解离相关的时间电性反应,这意味着非特异性物质与特异性生物标记物分子同时解离,对于无抗原血清样品的一显著 k_{off} 约为 $2.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 。图15显示在缓慢流动条件下的血清解离曲线以及拟合。

[0210] 因此所选择的低亲和性抗肌钙蛋白抗体受体不太适合于解离区段窗口的有效分离和复杂生物样品中抗原分子的定量检测。

[0211] 接下来,使用对其特异性抗原具有显著更强结合亲和性的抗体受体。使用较高亲和性的抗体,其特征在于其抗原的解离速率较低,导致生物标记物蛋白与抗体被固定的SiNW装置的解离时间更长,因此能够将低亲和性快速解离子区段(离子物质、非特异性蛋白质、小化学物质和细胞)与高亲和性慢解离子区段分开(抗原)。在本实施例中,使用小鼠单株抗人类癌症抗原15-3IgG(抗CA15-3)。图16显示在缓慢流动条件下,血清中的抗CA 15-3抗体解离曲线以及拟合。获得的 k_{off} 是 $k_{off} = 6.2 \times 10^{-4} s^{-1}$,表明与其抗原的强结合相互作用。

[0212] 图17A至图17D显示使用解离区段模式方法,CA15-3抗原在未加工的血清样品中的浓度依赖性传感,其流速为每分钟1腔室-体积交换。在图17A中,黑色、红色、蓝色和绿色曲线显示一代表性抗CA 15-3修饰的SiNW FET传感装置,对其特异性抗原CA 15-3的结合和解离(升高阶段)的完全原始电性反应,在未处理的牛血清样品中,浓度分别为0(对照组无抗原样品)、55、135和535皮摩尔浓度。在图17B中,黑色、红色、蓝色和绿色曲线显示抗CA 15-3修饰的SiNW FET传感装置的标准化的解离区段的电性反应,在未处理的牛血清样品中,浓度分别为0(对照组无抗原样品)、55、135和535皮摩尔浓度。在用低离子强度传感缓冲液洗涤之前,使每种抗原样品流动约6分钟(直到到达结合平台期)(传感缓冲液SB,155微摩尔浓度的磷酸钠缓冲液,pH约8.0)。黑色箭头表示从未处理的血清样品到低离子强度传感缓冲液的溶液交换时间。图17C显示沿着图17B中测量的解离区段曲线在不同时间点所提取的CA 15-3抗原浓度依赖性校正曲线。黑色正方形、红色圆形、蓝色、绿色、粉红色和棕色三角形分别对应于图17B中描绘为黑色、红色、蓝绿色、粉红色和棕色虚线的时间点。所述曲线显示以绿圆圈标记的分析相关的高亲和性区段,在沿着图17B中解离曲线450秒后开始。红色圆圈描绘沿着解离区段曲线的非分析相关的时间点。图17D显示CA 15-3抗原的浓度依赖性校正曲线,在图17C中绿色标记的分析相关时间点。

[0213] 图17A至图17D证明选择更高亲和性的抗体受体允许解离区段窗口解卷积(deconvolution)成两个解离子区段,一个非特异性快速解离子区段和一个特异性慢速解离子区段,以100微升/分钟的流速下(每分钟1腔室容积交换,腔室容积100 μ L),区段间转变时间约为250秒。

[0214] 从得到的曲线(图17A)可以看出,解离窗口由两个明显分开的子区段组成,一快速解离区域持续约250秒,然后是一缓慢解离的平台状区域,持续数十分钟没有相当大的变化,并且其幅度与电性基线信号不同,所述电性基线信号为在低离子强度缓冲液下装置与抗原的先前相互作用。所述观察结果表明,抗原分子与纳米线材固定的抗体物质保持结合的时间,比完全去除低亲和性非特异性化学物质所需的时间长得多, $k_{off}^{antigen} > k_{off}^{nonspecific}$ 。此后解离区的特征在于一电性反应,高于传感缓冲液基线的一电性反应(图17B,水平虚线蓝线)显示出对血清中抗原蛋白CA 15-3浓度的强烈且可再现的依赖性,其中保持与SiNW FET装置表面紧密结合。

[0215] 通过使用再生缓冲液(甘氨酸缓冲液(glycine buffer),pH=3)显示蛋白质抗原的存在限制在纳米装置表面的进一步实验证据,其迅速带来高亲和性抗原-抗体的解离,在随后的低离子强度传感溶液流动之后,并使纳米装置的电性反应返回其初始基线电性水

平。这在图18中显示来自其抗体修饰的纳米线材装置的CA 15-3抗原的再生曲线图。

[0216] 另外,在未处理血清样品上进行的浓度依赖性实验,对掺入不同浓度的CA 15-3抗原,揭示所述定量检测方法的稳健性,其根据解离区段窗口的简单检查。随着测试血清样品中CA 15-3的浓度增加(图17B),更多的生物标记物分子与SiNW装置的表面相关联,导致稳定的更大电性反应(相对于SB基线反应)。

[0217] 抗CA 15-3抗体与抗原CA 15-3之间的强特异性相互作用允许在传感通道内完全洗涤非特异性吸附的盐和生物分子,通过用低离子强度传感缓冲液进行快速冲洗,同时维持大部分与表面结合的CA 15-3抗原分子,以定量地测量其样品浓度。

[0218] 因此以高亲和力能力监测来自抗体固定的表面的抗原解离区段,允许使用根据SiNW FET的装置进行直接分析检测,而不施用任何样品操作步骤。这允许进行定量蛋白质测量,对于相关生理浓度范围(大于67皮摩尔浓度)的CA15-3的临床诊断具有足够敏感性。

[0219] 因此显示在约 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 和约 $1 \times 10^{-8} \text{s}^{-1}$ 之间的范围内的解离速率的抗体物质可以根据本发明的一些实施例作为检测受体。

[0220] 通过控制增加解离流速步骤,可以选择非特异性物种解离子区段窗口,使得也可以使用较低亲和性的抗体。

[0221] 在本发明的各种示例性实施例中,在解离开始之前,实现抗原物质的完全结合,例如如电性信号平台期所证实的。当需要浓度依赖性分析传感结果时,这是有利的,因为待测抗原的最终浓度是根据在抗原结合之前的低离子强度条件下的基线电性信号与从传感装置附近完全除去低亲和性物质后所达到的解离曲线平台期(高亲和性区段)之间的差异来计算的。因此,由于在传感期间施加的抗原结合时间的差异,结合的抗原物质的量对纳米传感装置的变化,可能引起提取的浓度依赖性校准曲线的变化。

[0222] 因此,在本发明的各种示例性实施例中,应用一恒定的抗原结合时间段用于分析一致性,或者允许完全结合。

[0223] 为了定量评估抗原浓度,首先通过将传感装置暴露于无抗原血清样品来测量解离子区段之间的过渡时间。所述样品作为提取准确时间点的参考,其中实现了完全去除低亲和性物质。在这个时间点之后,可以确信地进行抗原浓度的准确定量评估,如在图17C和17D中所示,假设抗原物质缓慢解离。

[0224] 发明人发现这种校准步骤不是必需的。现在将参考图19A和图19B解释这一点,其通过使用特异性和非特异性化学修饰的SiNW FET装置,以330腔室-容积/分钟的流速显示CA 15-3抗原的多重单芯片差异检测。因此,本实施例的传感阵列可以用两种主要类型的化学修饰的纳米装置而制造,其中第一组代表传感纳米装置,在检查下针对抗原的特异性抗体进行化学修饰,其中第二组纳米装置用非免疫反应蛋白(或非特异性抗体受体)进行化学修饰,并作为芯片上内部参考装置。

[0225] 由于在测试的生物样品中不存在与抗原的特异性相互作用,后一组装置仅与生物样品中存在的低亲和性快速解离物质非特异性相互作用,并且允许简单提取准确的过渡时间,其中达到第一个解离子区段并可以进行抗原浓度的定量评估。因此,使用这些非反应性芯片上参考装置允许以实时模式同时灵敏地和定量地检测生物标记物。另外,增加与解离相关的冲洗步骤的流速可导致低亲和性快速解离子区段时间窗口的变窄,从而允许更快和更准确的抗原物质的定量检测。为此目的,使用较小尺寸的微流体腔室,以便允许相当高的

标称流速(腔室容积交换率),以使用流体泵送系统可容易地实现的流速。

[0226] 此外,使用较小尺寸的微流体通道,而不是先前使用的100微升的较大腔室,可以在解离洗涤区段期间导致更有效的流体交换,以及相当低的生物样品体积的关键需求,其可能低于数微升。图19A和图19B显示根据上面讨论的差异性的芯片上检测方法,执行用于检测CA 13-5生物标记物的测量,这次使用相当高的100微升/分钟的有效流速(腔室体积交换速率为每分钟330腔室容积,腔室容积为0.3微升)。

[0227] 通过比较从非免疫活性蛋白修饰的纳米线材装置获得的解离曲线与从特异性抗体修饰装置获得的解离曲线,可测量生物标记物的量,所述生物标记物是与抗体修饰的纳米线材基装置相关。BSA蛋白修饰的SiNW装置在冲洗传感缓冲液后约25秒达到平台期(图19A红色和蓝色曲线),BSA蛋白对生物标记物CA 15-3没有特异性。在快速流动条件下,无抗原血清解离曲线与图20中的拟合一起显示。计算的 k_{off} 约为 $1.4 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

[0228] 来自抗体修饰的SiNW装置的解吸(desorption)动力学相当慢并且与靶抗原的浓度很高地相关。施用更快的溶液交换速率将快速解离子区段窗口缩小了10倍,从大约250秒到大约25秒,从而允许更快的检测周期而无需离线(off-line)校准步骤,同时不影响抗原生物标记物的定量和敏感准确评估。这些结果表明,合适的 k_{off} 值的生物受体以及使用足够尺寸的微流体室(允许尽可能快的流体交换)的同时组合,允许基于它们的分离区段的直接快速、灵敏和准确的生物分子检测。

[0229] 更快的流动条件允许使用具有相当低亲和性的抗体受体或其他生物受体。所述实施例中描述的技术可以应用于未处理的血液样品。在所述实施例中所进行的测量表明,在低流量条件下,在约300秒的时间后,可以完全去除低亲和性非特异性物质(血细胞、蛋白质、盐和小化学物质),并且在高流量条件下持续时间更短大约80秒。图21显示在缓慢流动条件下无抗原未处理的血液解离曲线以及拟合。得到的 k_{off} 为 $1.6 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

[0230] 本实施例证明了在复杂生物样品、血清和未处理血液中抗体修饰的纳米线材传感器的抗原解离区段于直接传感的应用。本实施例的技术不需要非原位(ex-situ)耗时的生物样品操作步骤,例如过滤、预浓缩和脱盐。

[0231] 高亲和性抗体受体以及高溶液交换流速的组合,导致复杂解离子区段窗口有效地解卷积成两个完全分离的解离子区段,从而允许定量检测生物标记物质。没有非原位(ex situ)生物样品操作的耗时过程而增强了传感平台的便携性,并将测试样品的所需体积减少到最小,因为其允许直接检测未经处理的生物样品(5至10微升的血液或血清),同时轻易地将检测周期时间缩短到不到5分钟,将检测周期持续时间缩短至不到5分钟。

[0232] 虽然本发明结合其具体实施例而被描述,显而易见的是,许多替代、修改及变化对于那些本领域的技术人员将是显而易见的。因此,其意在包括落入所附权利要求书范围内的所有替代、修改及变化。

[0233] 在本说明书中提及的所有出版物、专利及专利申请以其整体在此通过引用并入本说明书中。其程度如同各单独的出版物、专利或专利申请被具体及单独地指明而通过引用并入本文中。此外,所引用的或指出的任何参考文献不应被解释为承认这些参考文献可作为本发明的现有技术。本申请中标题部分在本文中用于使本说明书容易理解,而不应被解释为必要的限制。

图 1A

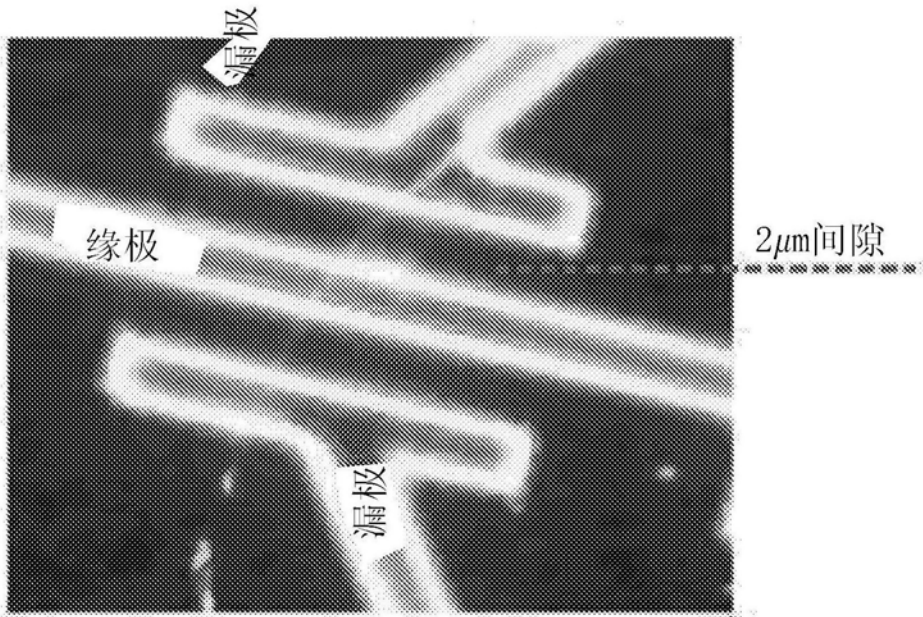


图 1B

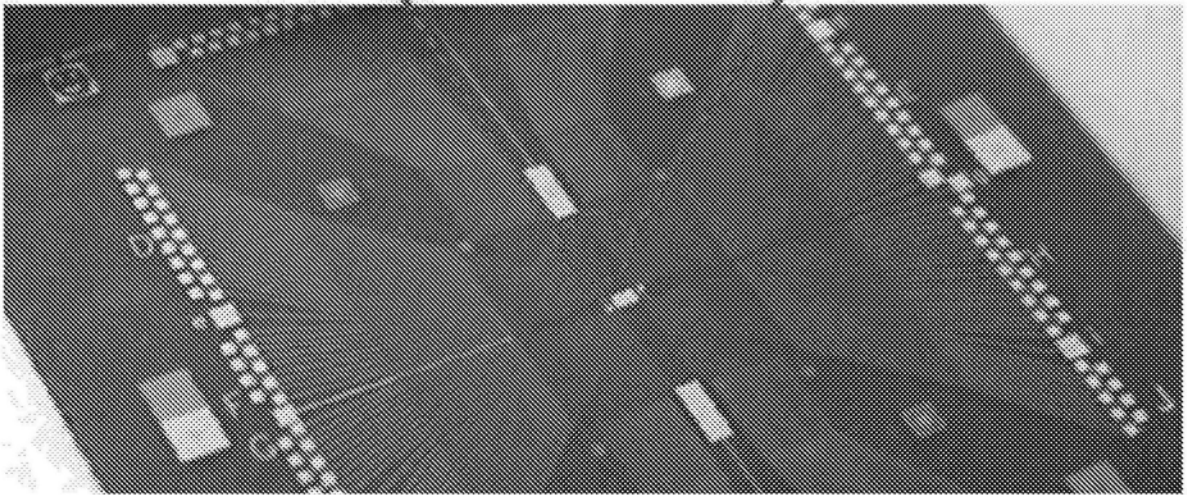


图 1C

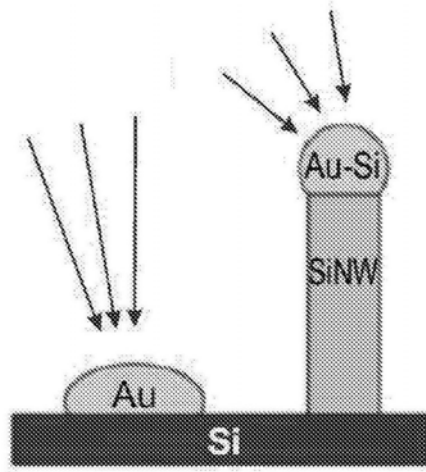


图 1D

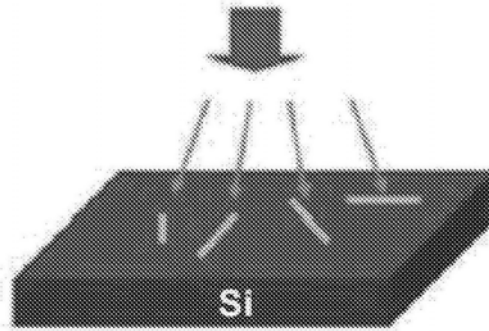


图 1E

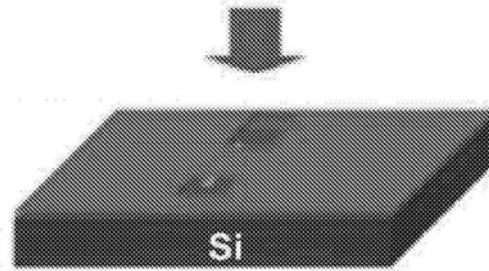


图 1F

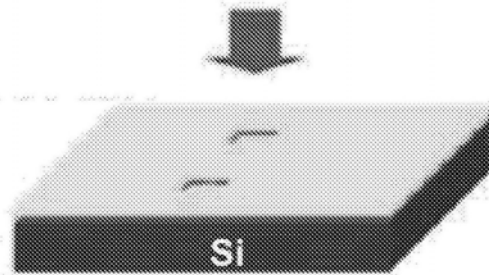
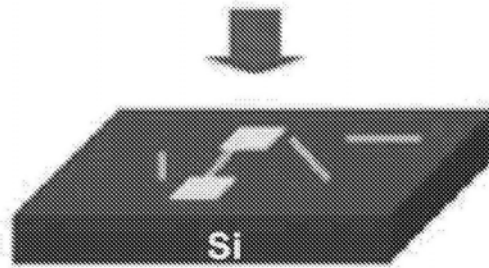


图 1G



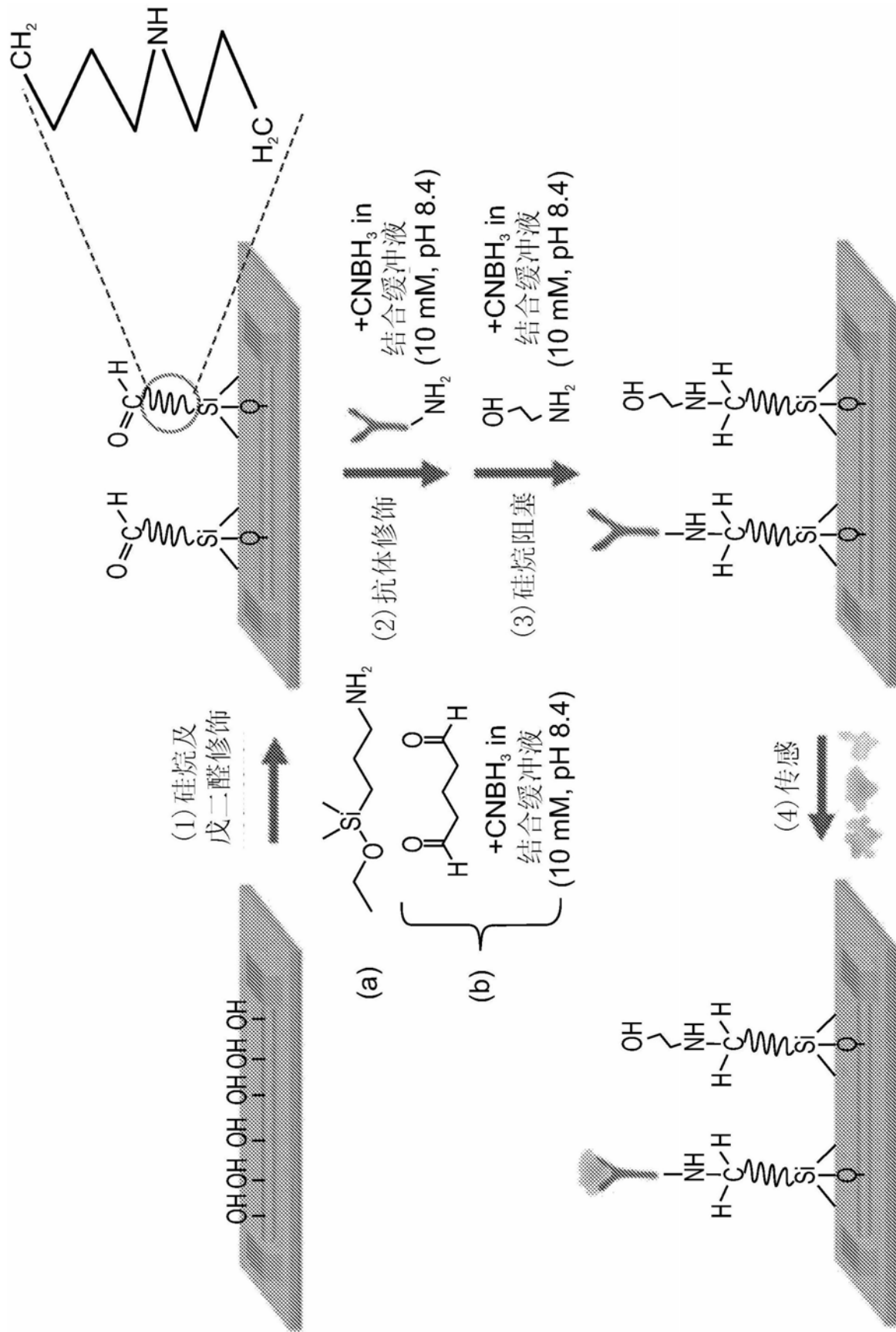


图2

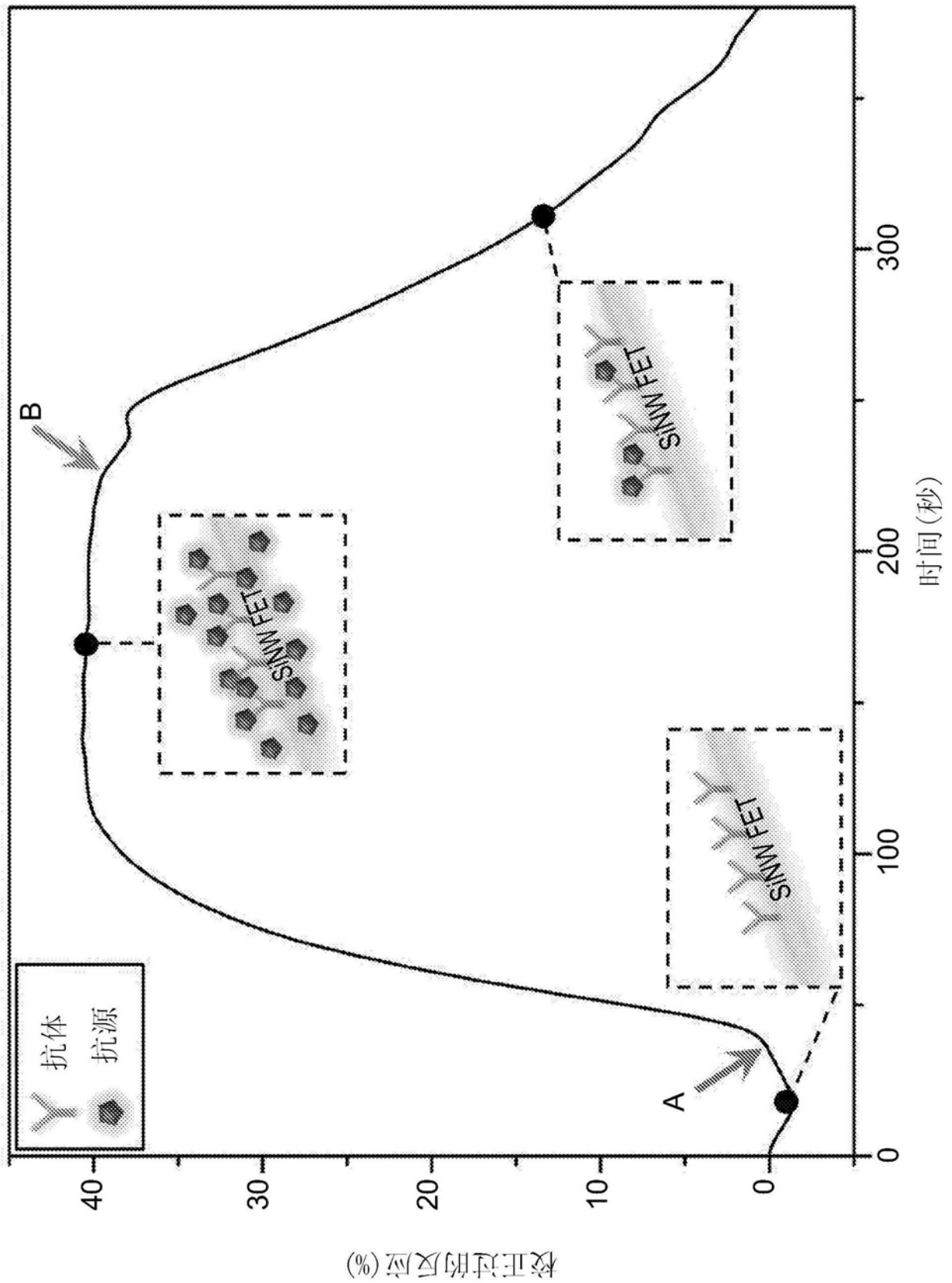


图3

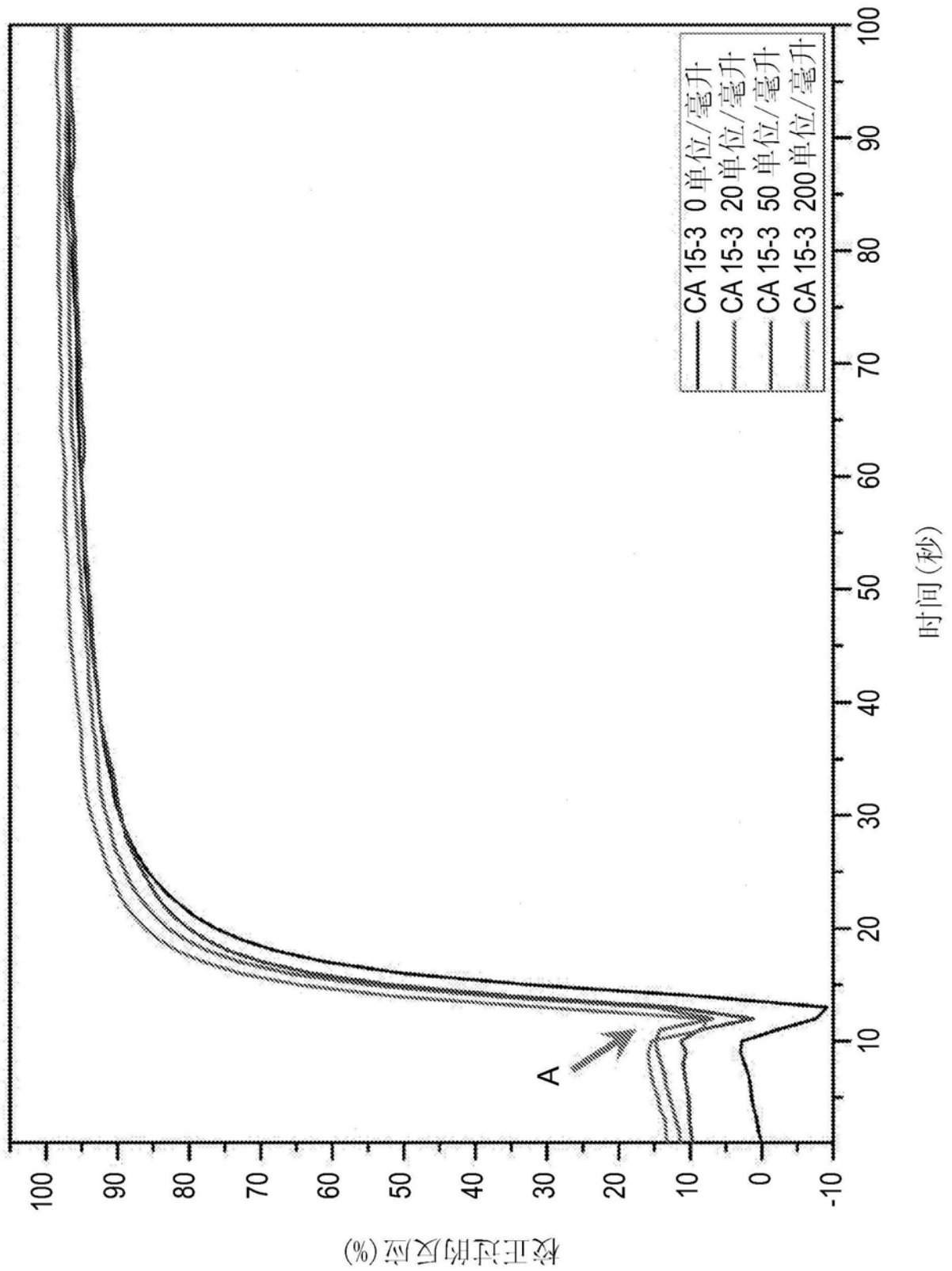


图4

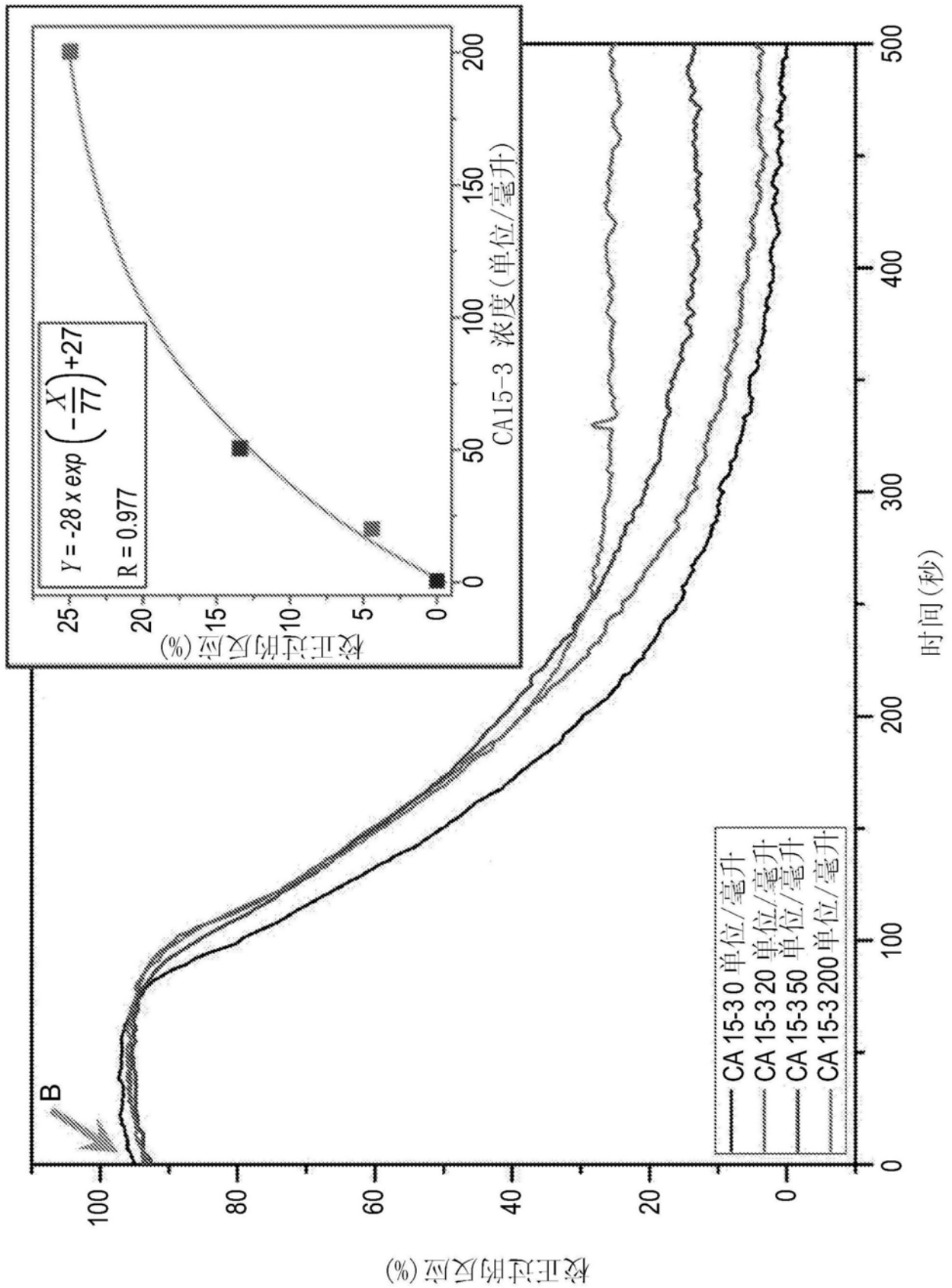


图5

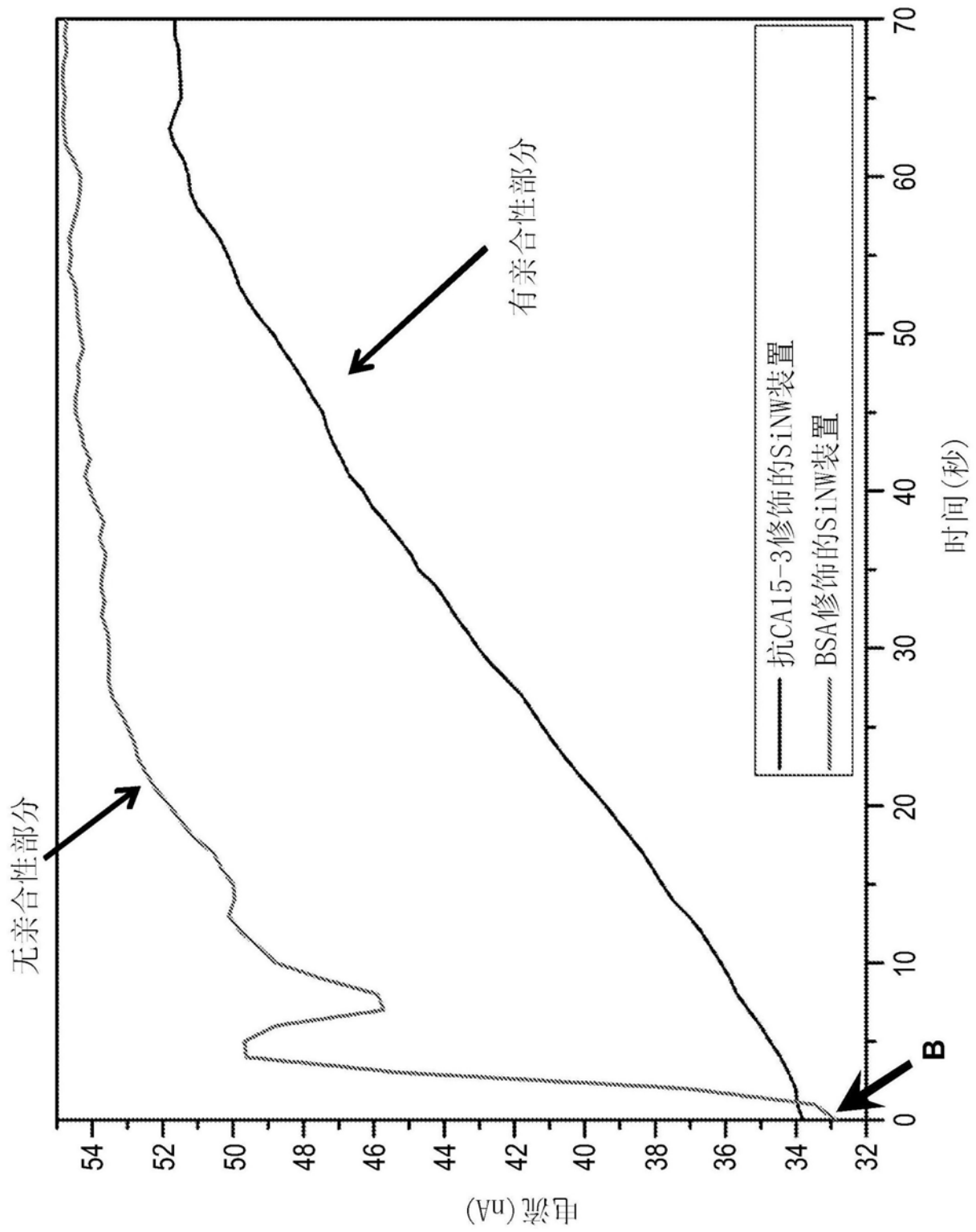


图6

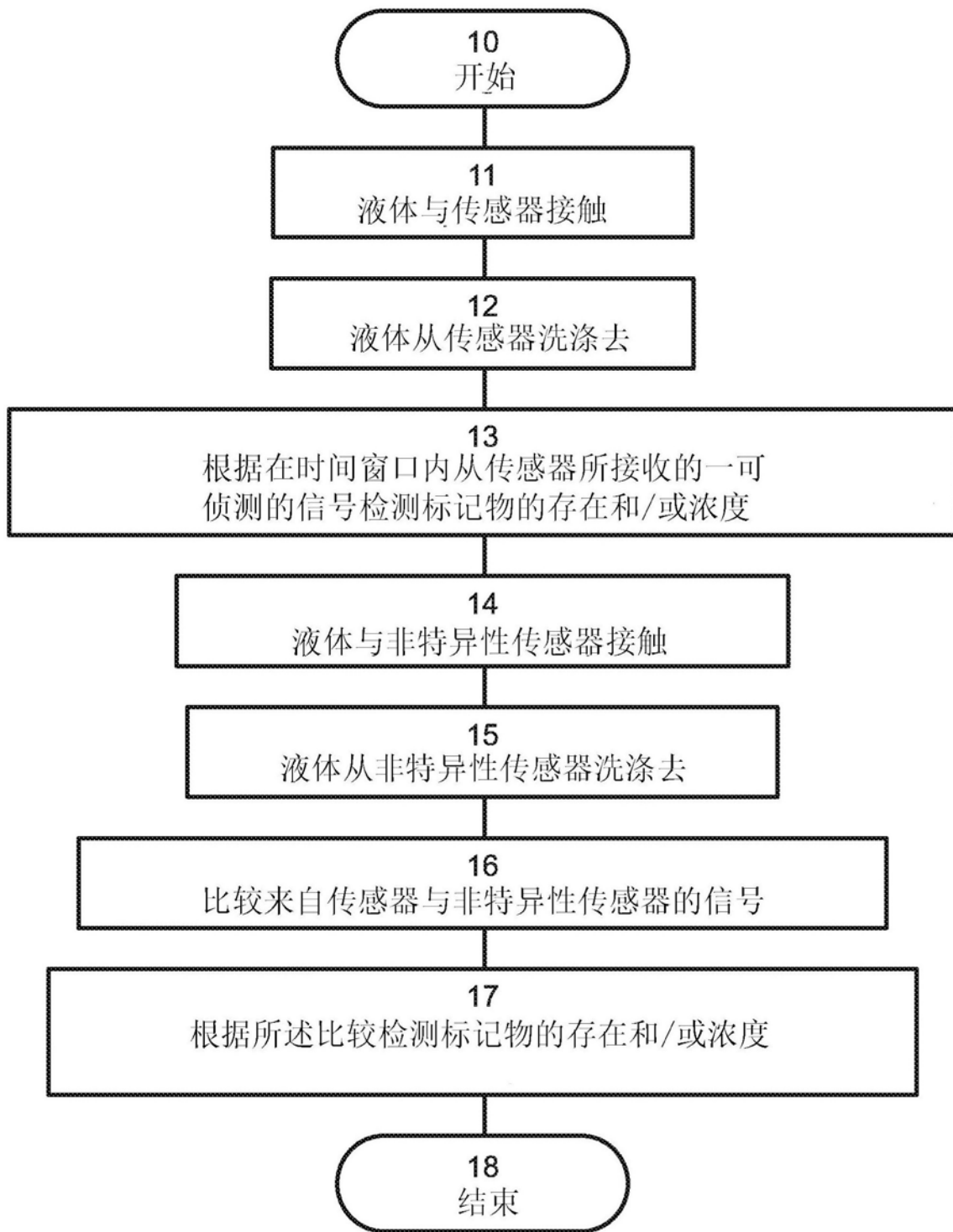


图7

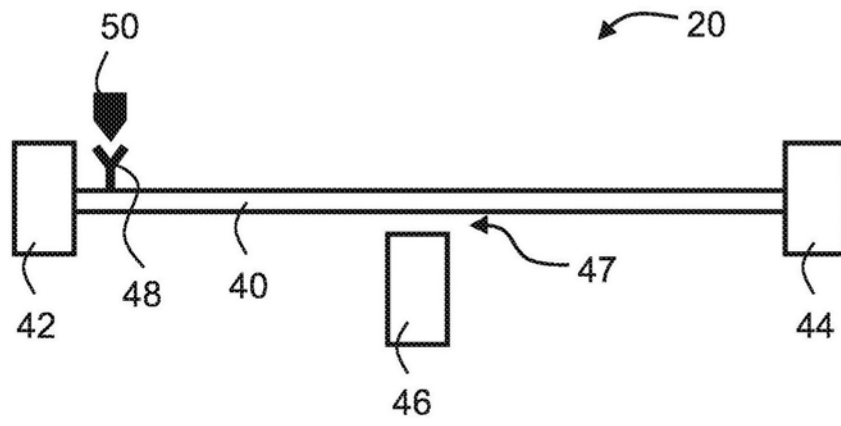


图8A

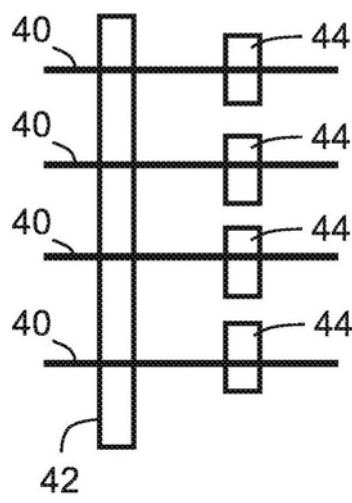


图8B

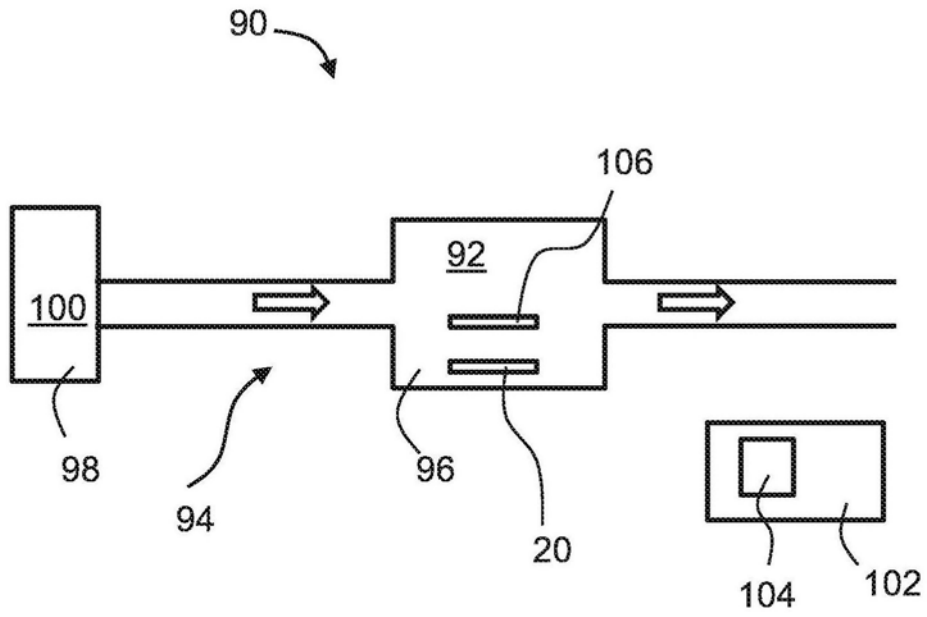


图9

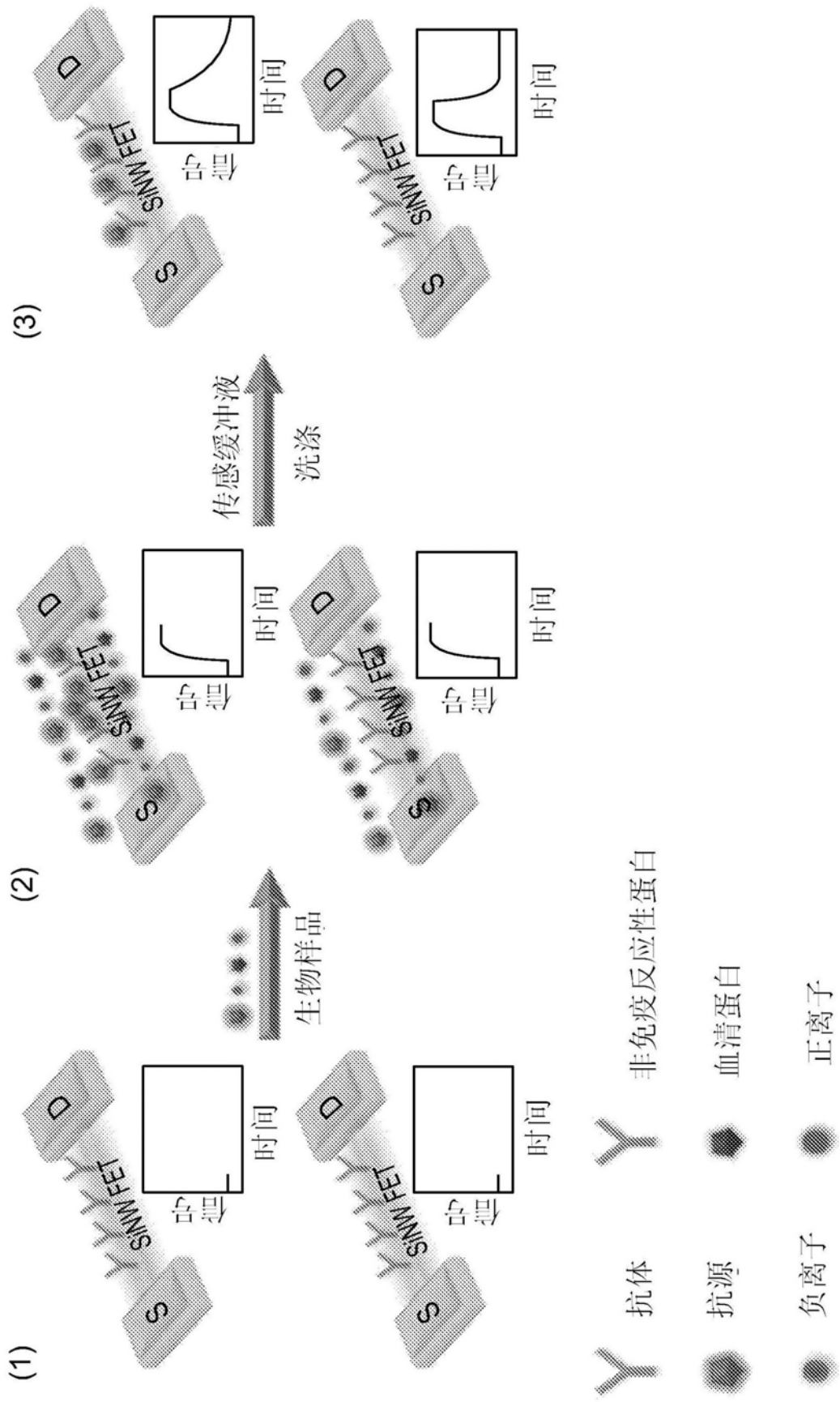


图10

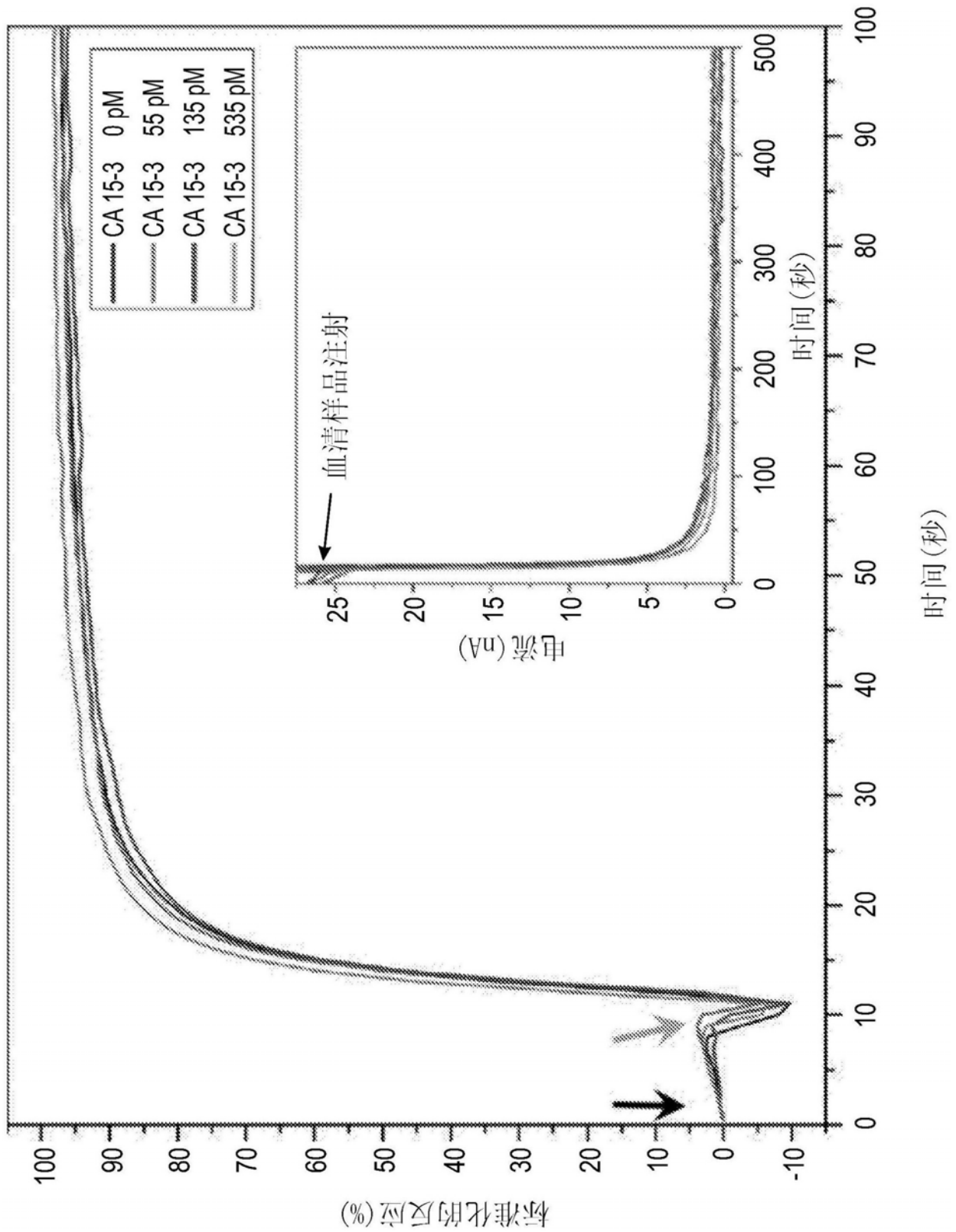


图11

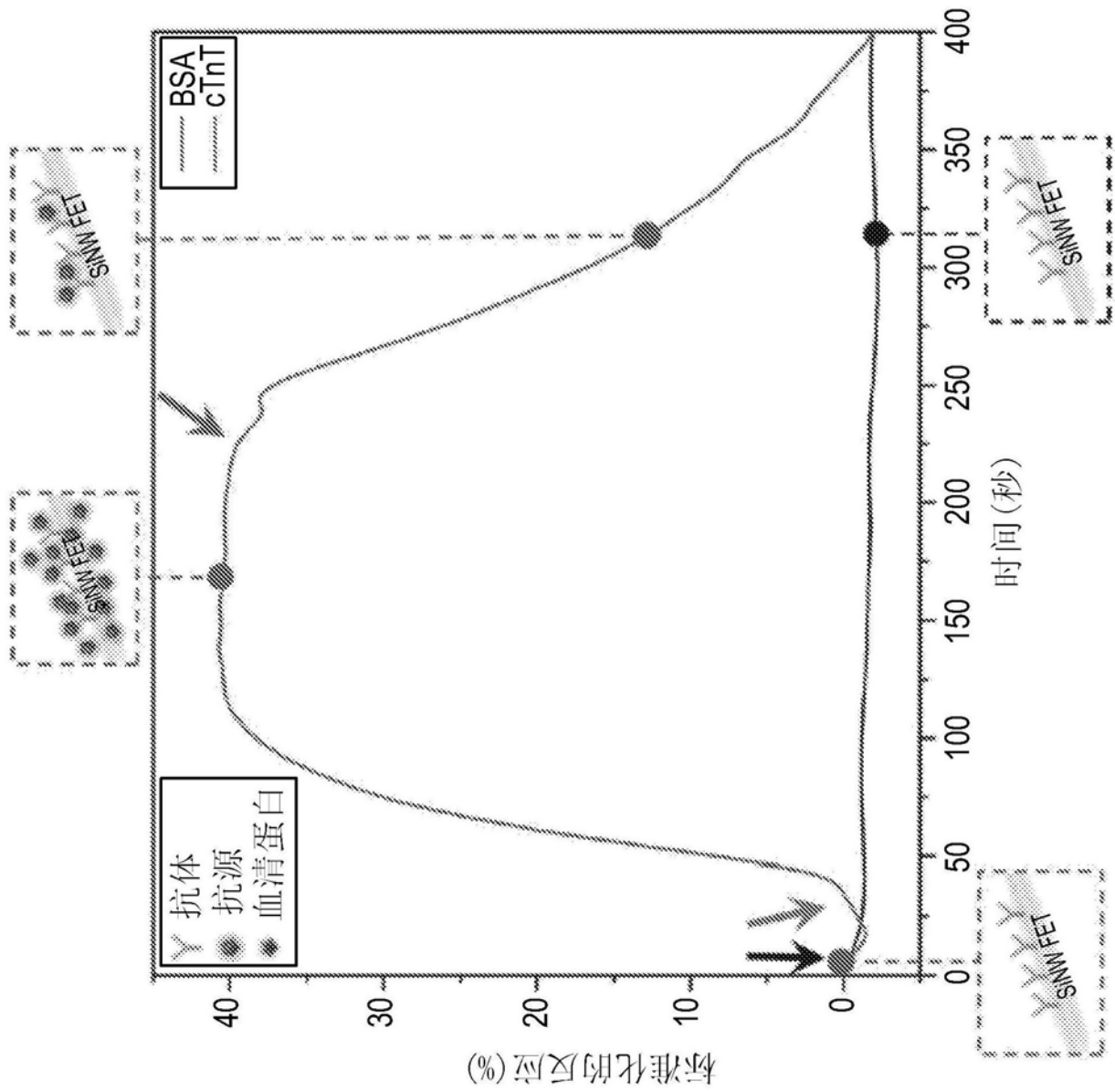


图12

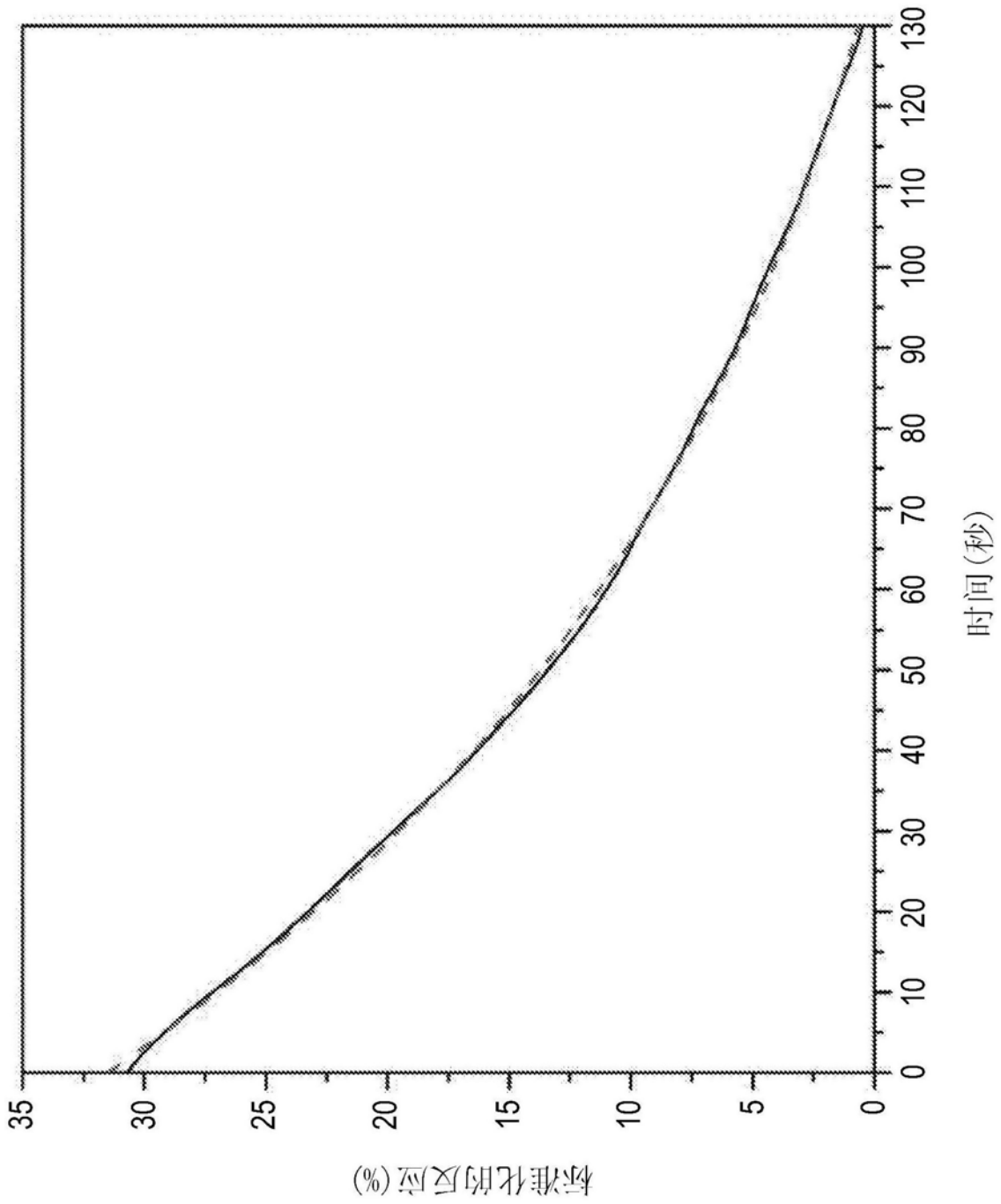


图13

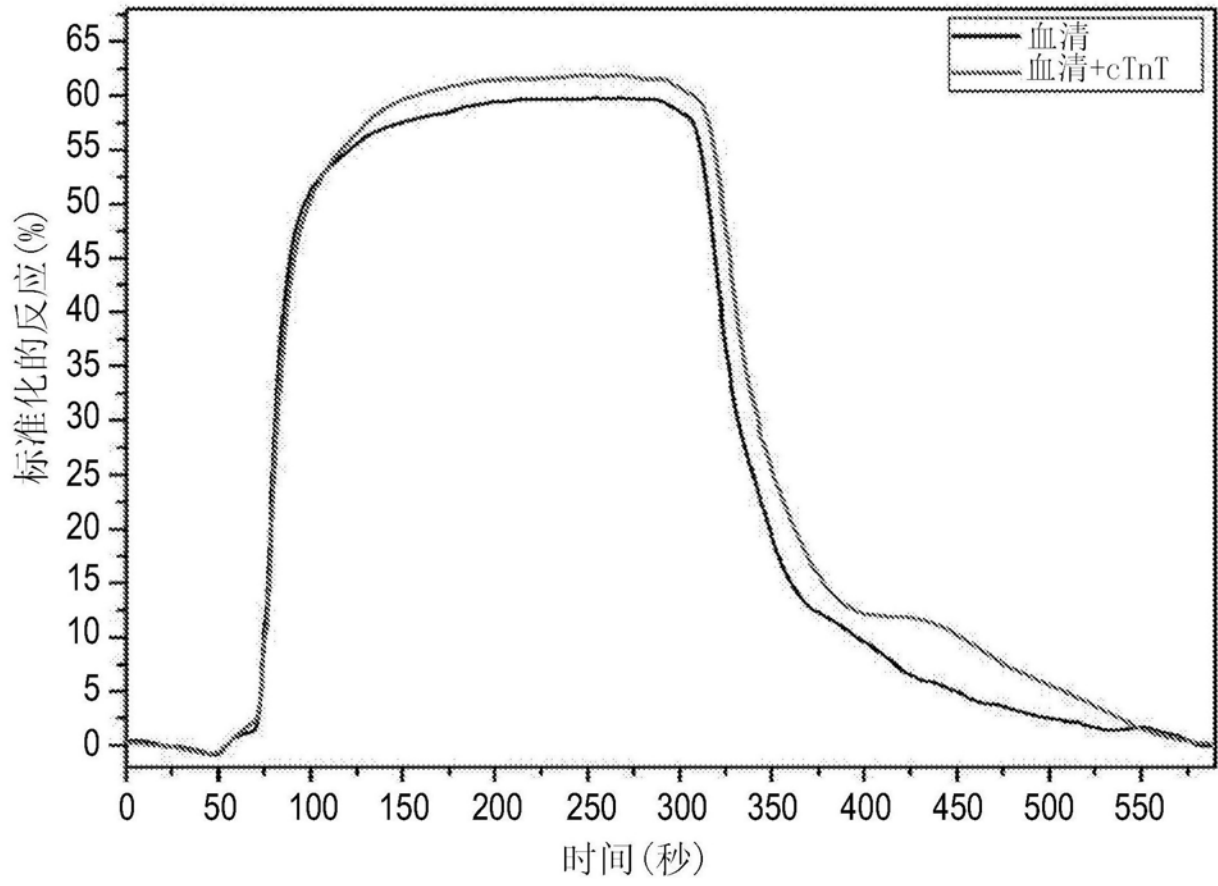


图14A

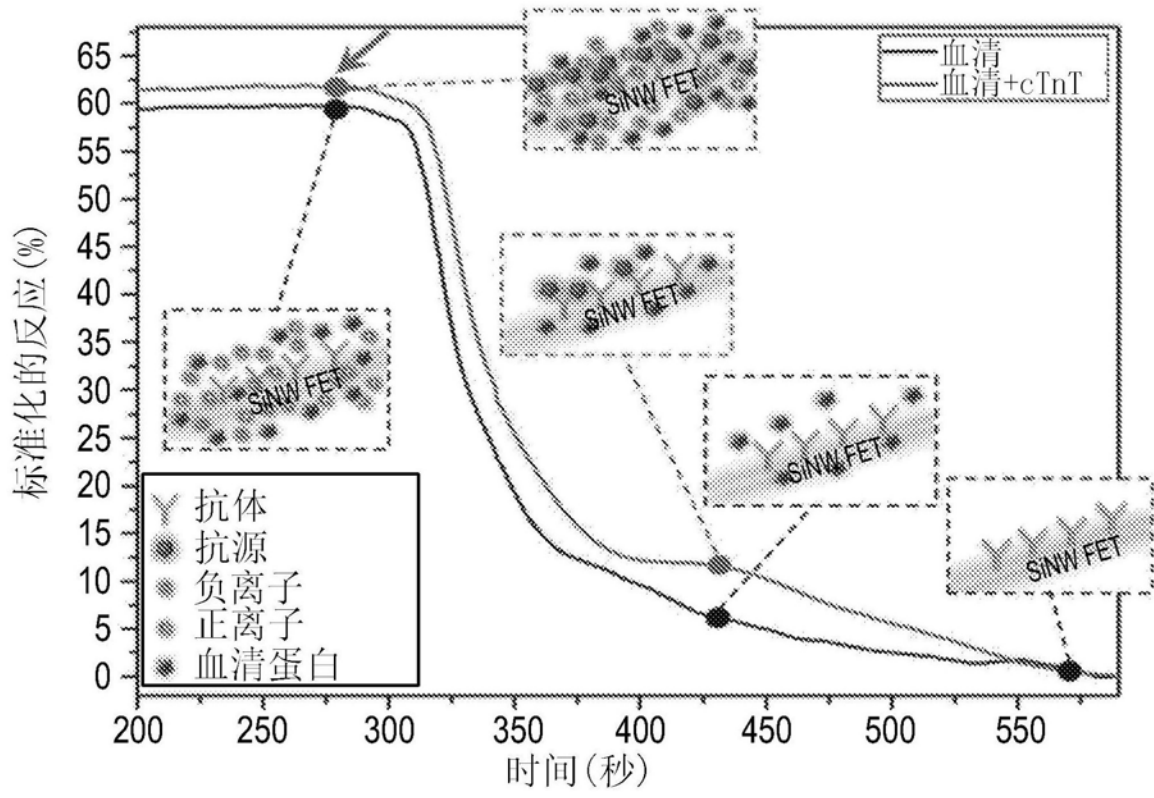


图14B

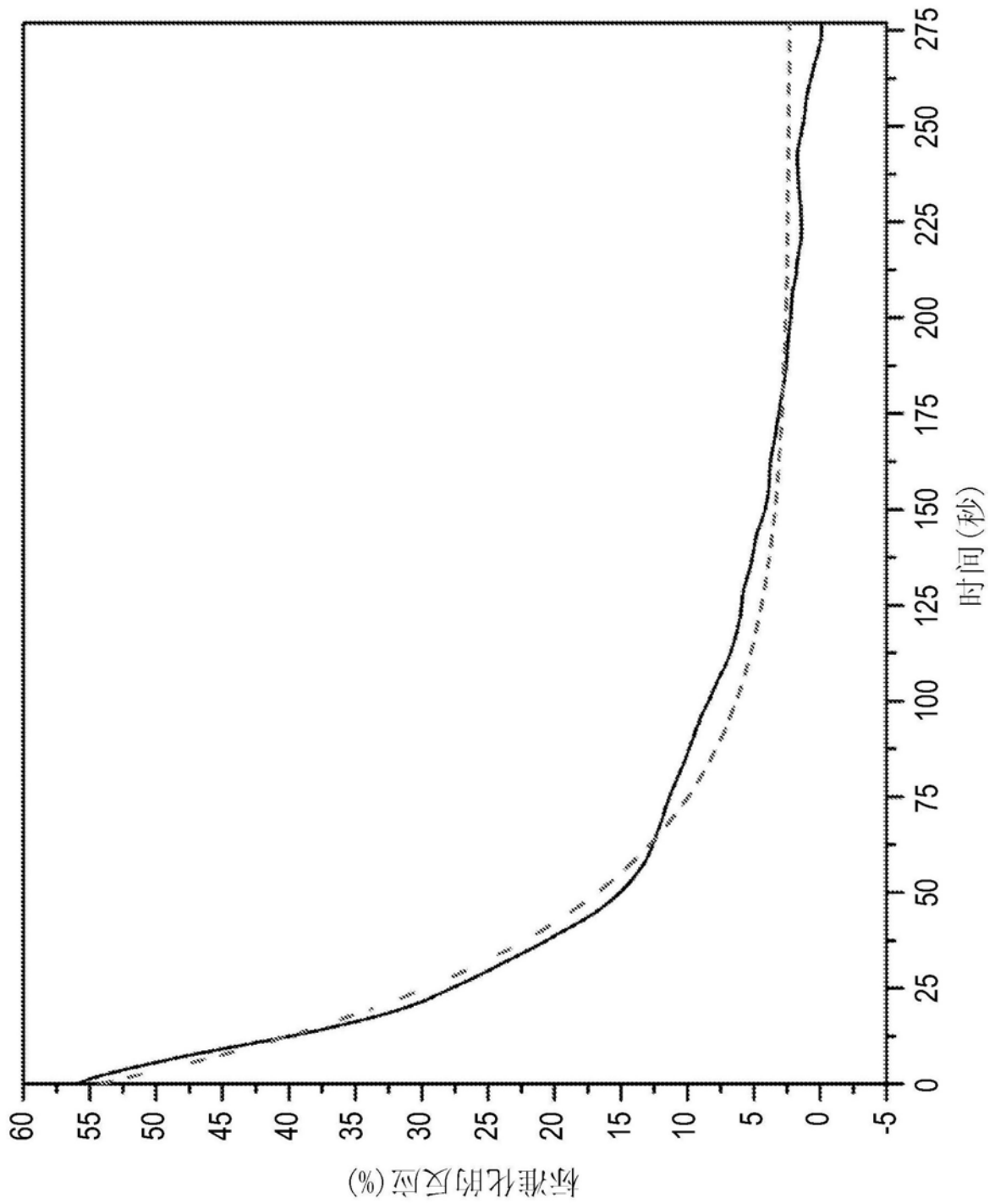


图15

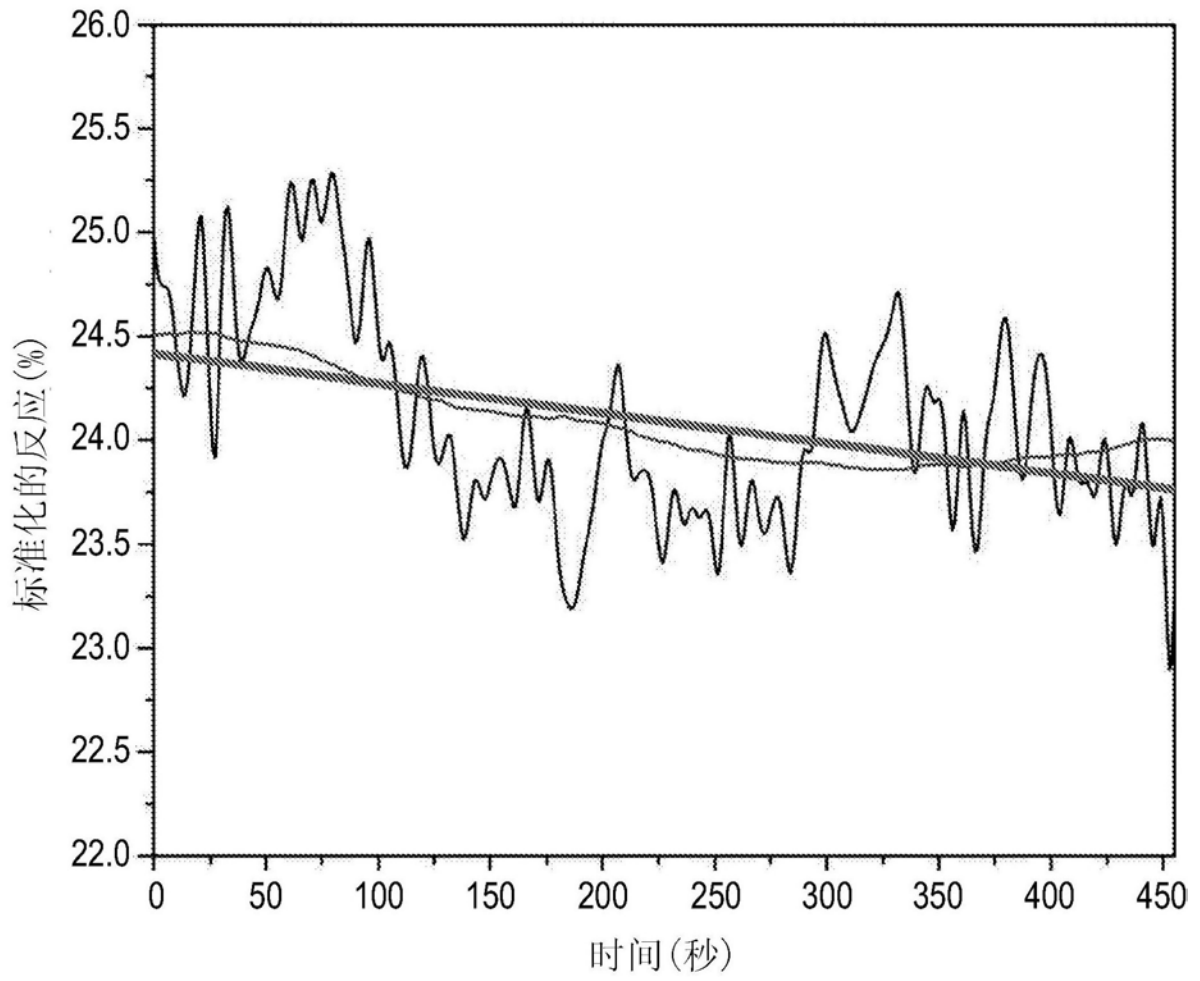


图16

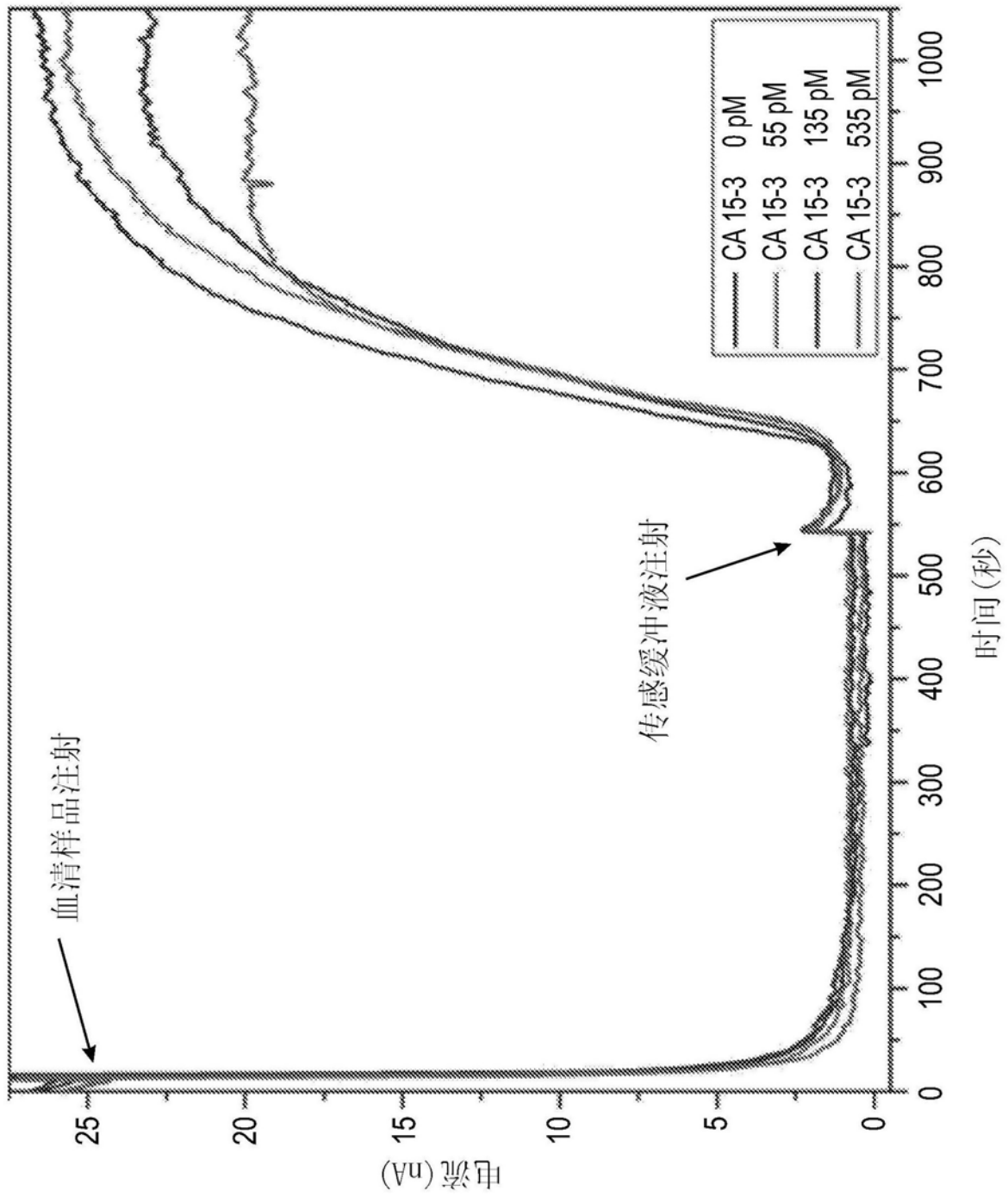


图17A

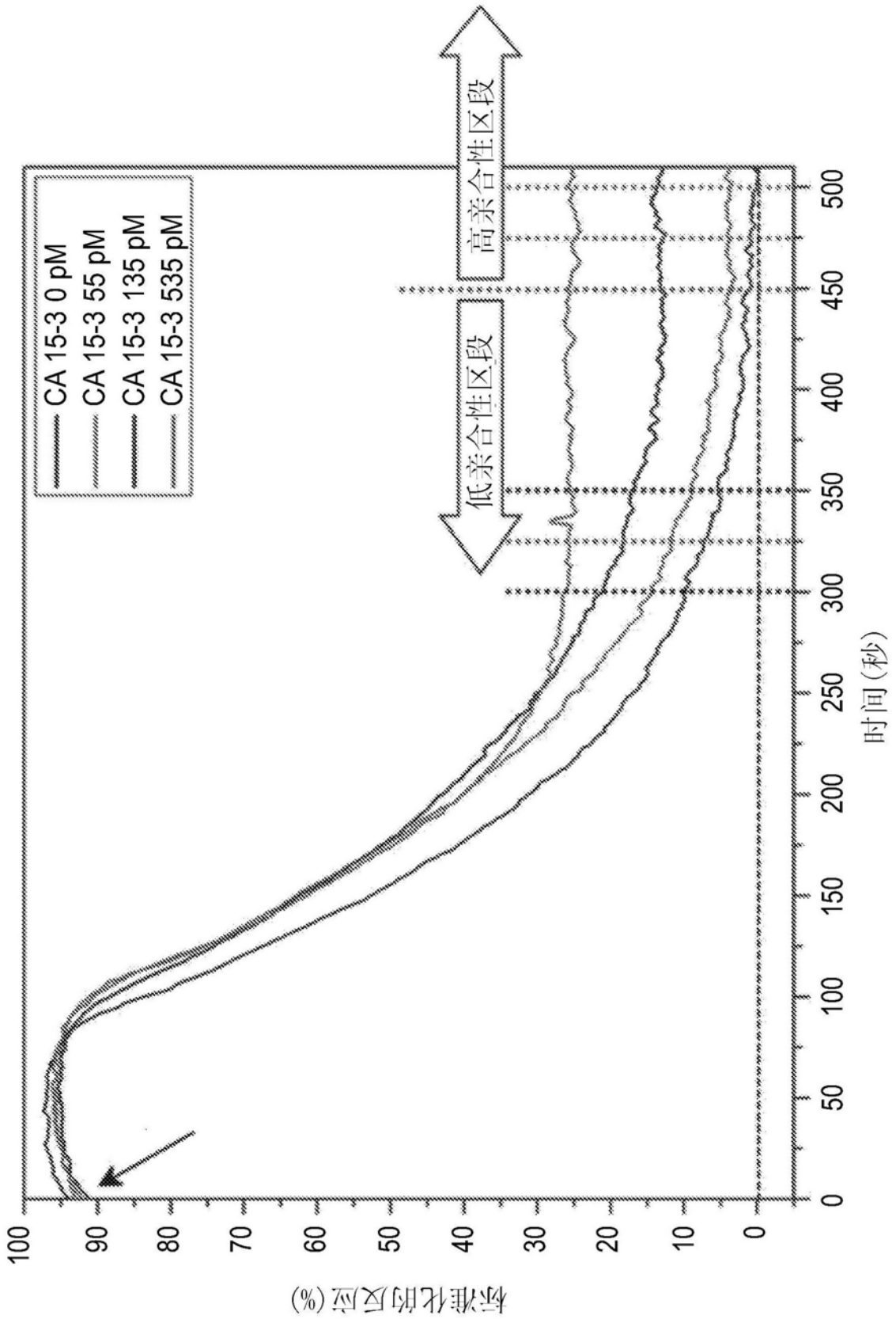


图17B

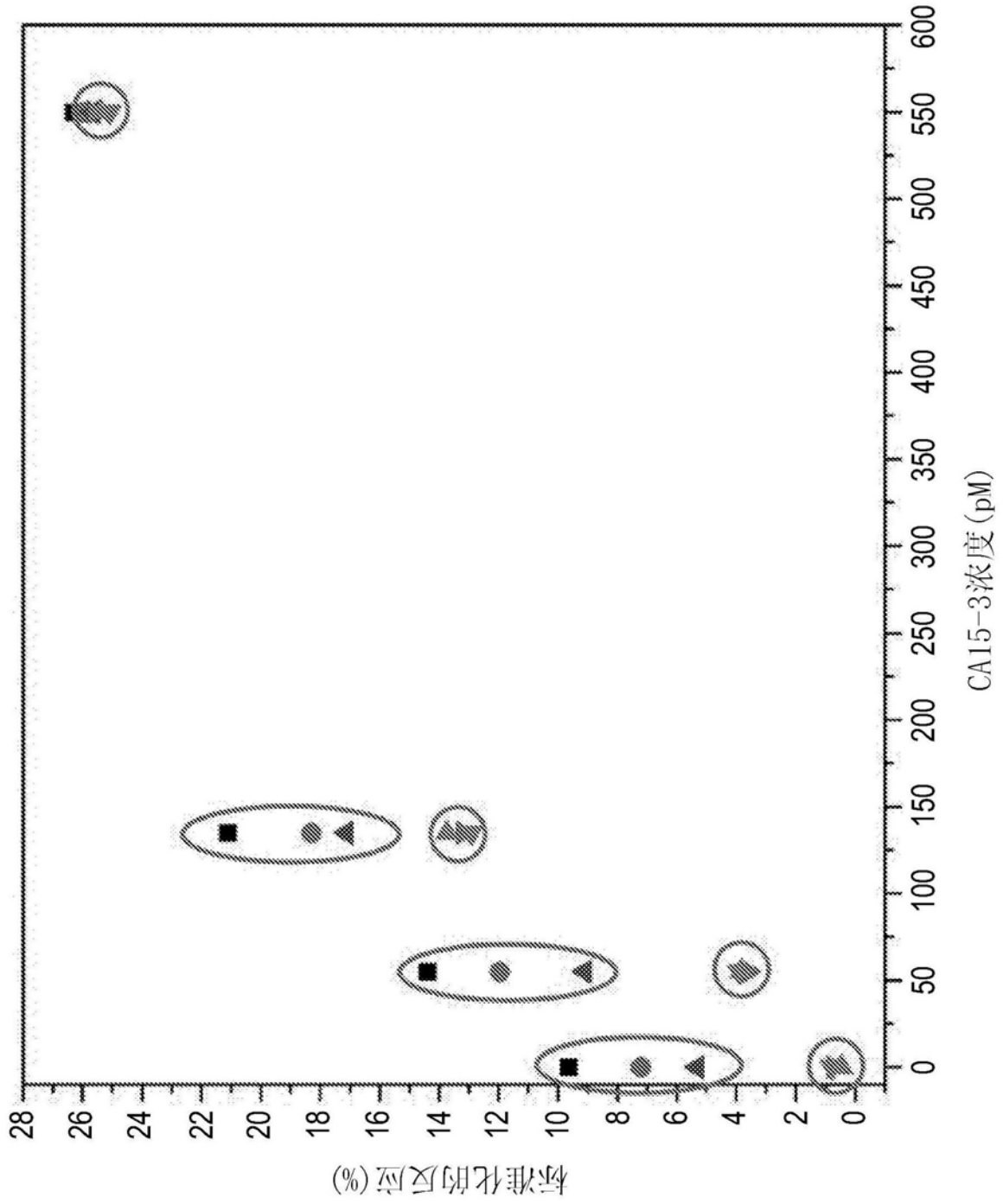


图17C

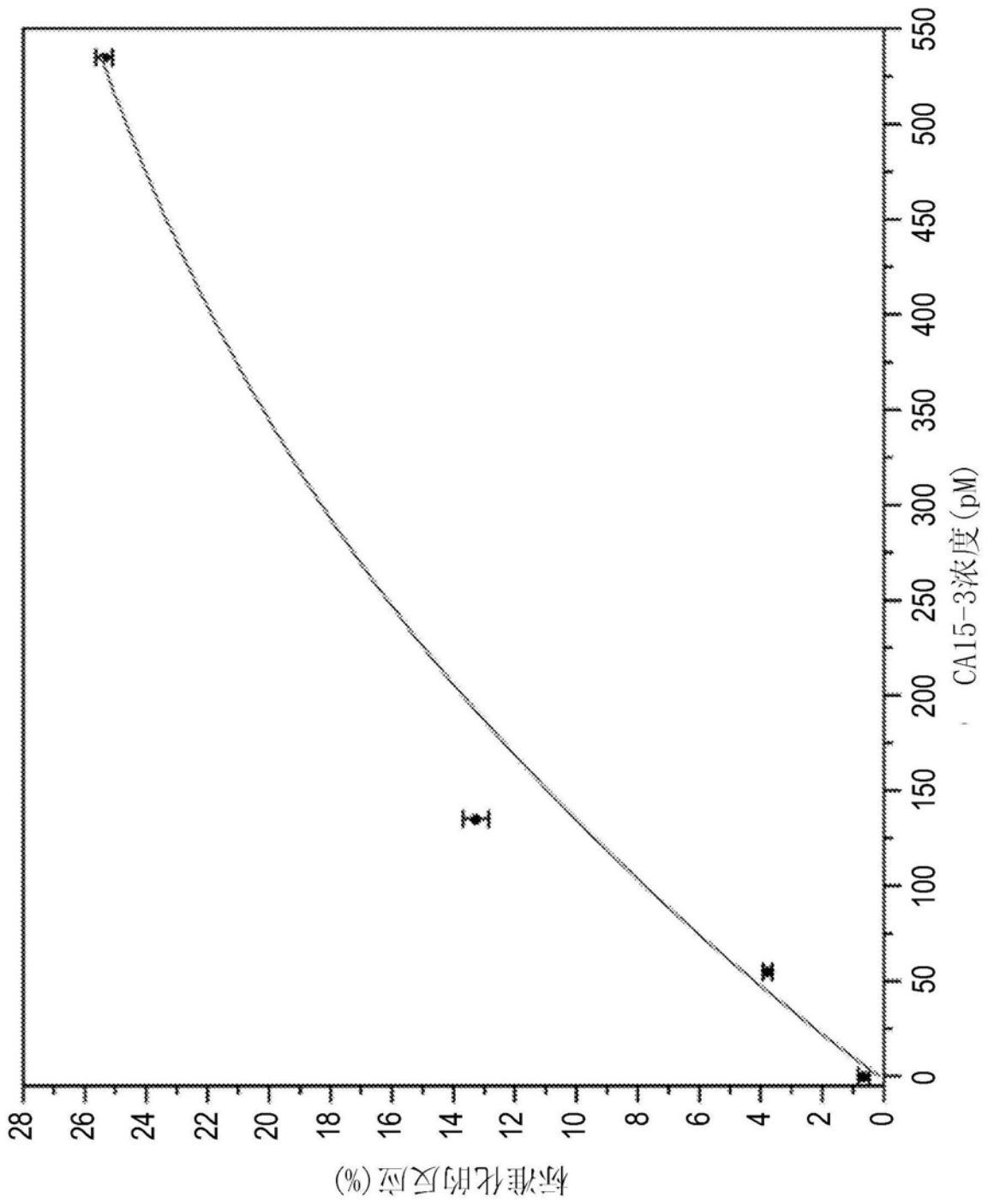


图17D

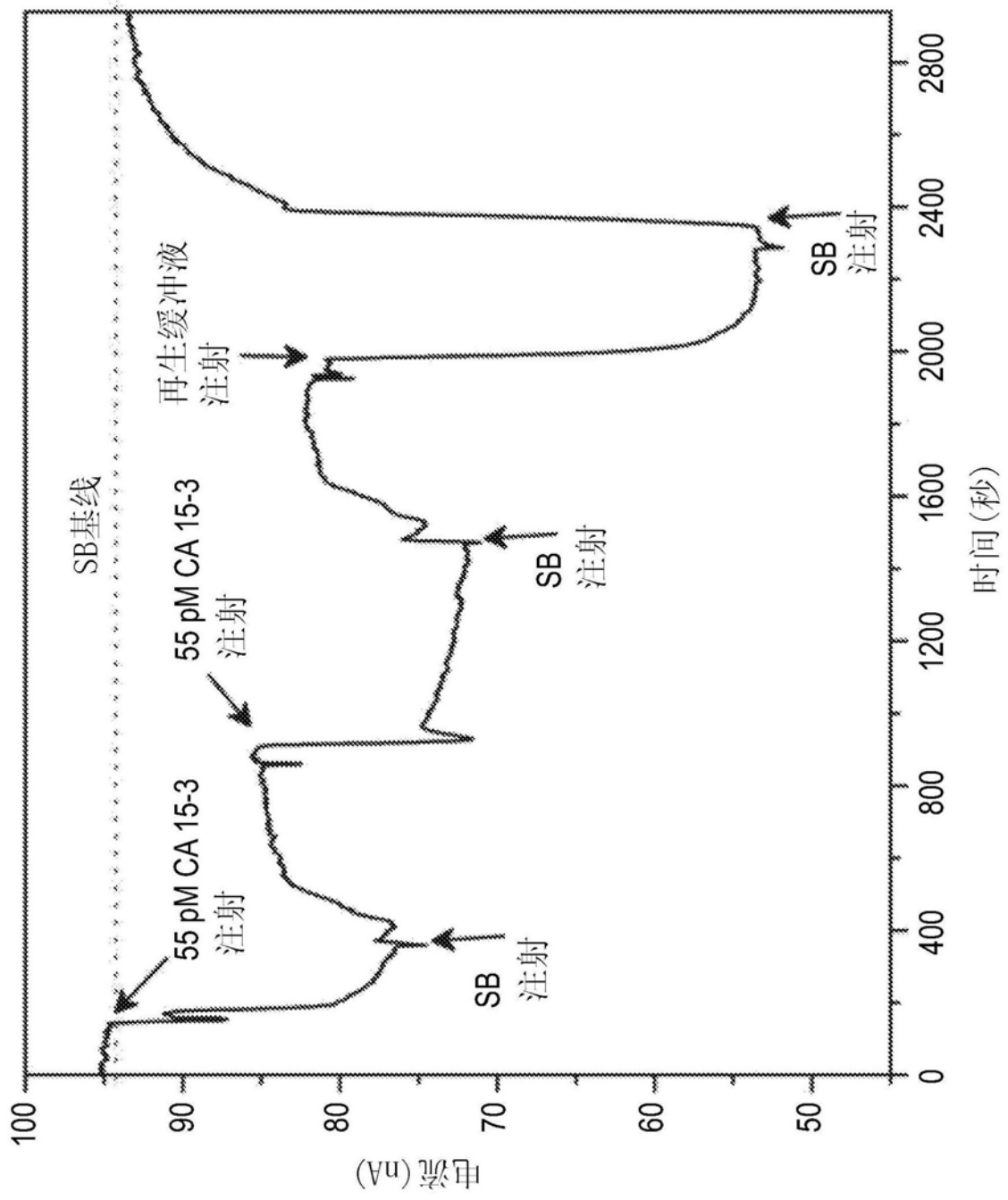


图18

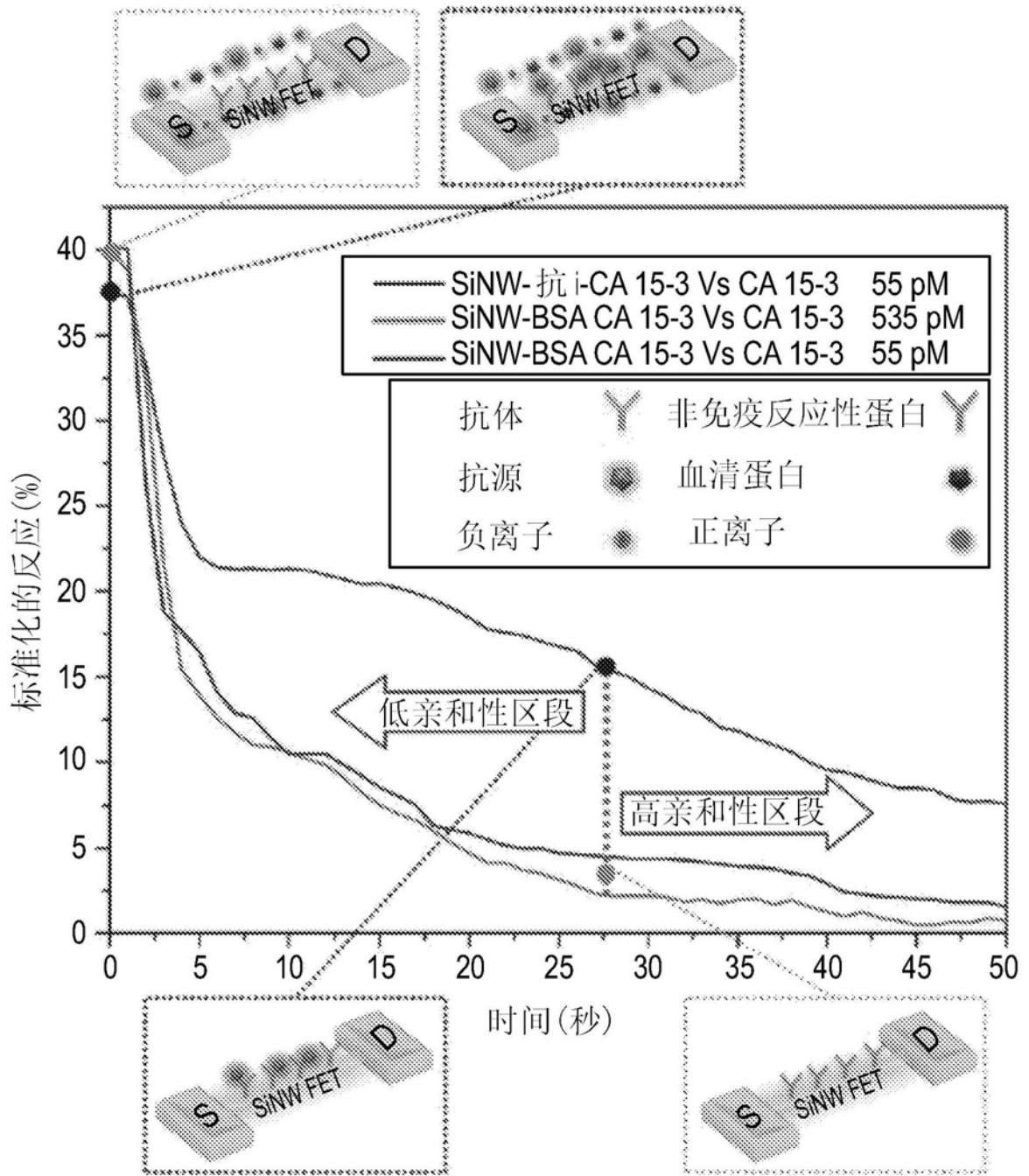


图19A

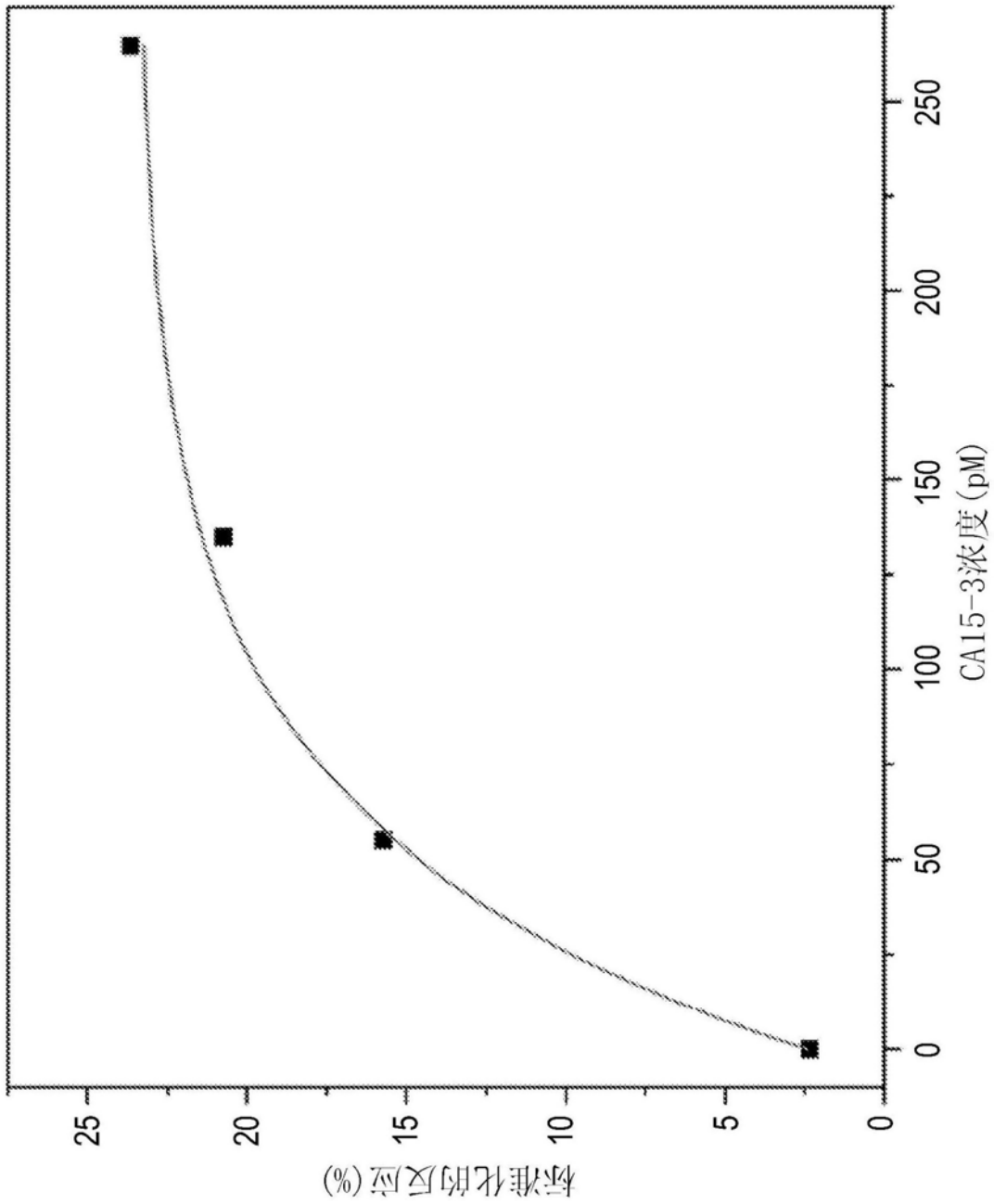


图19B

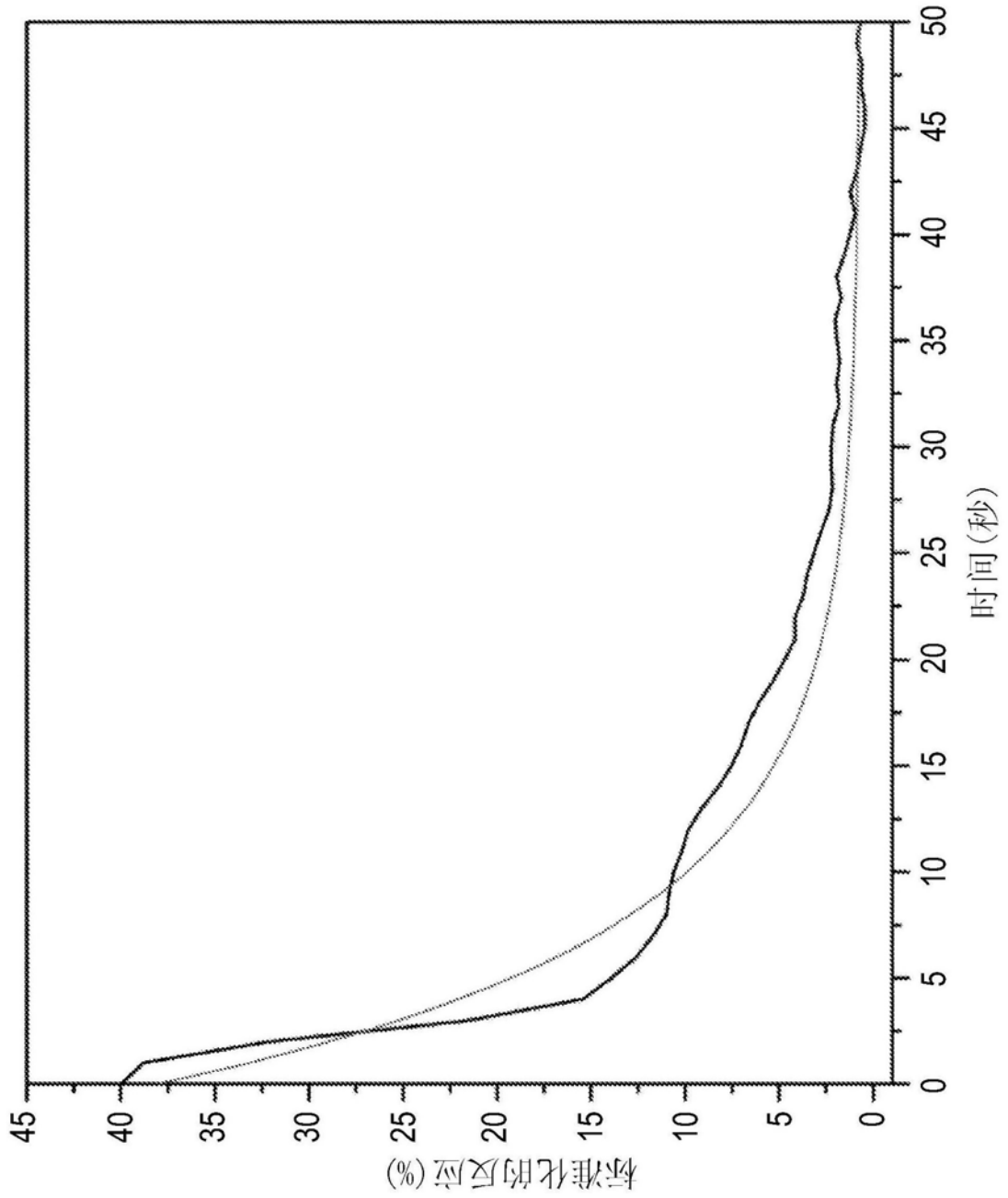


图20

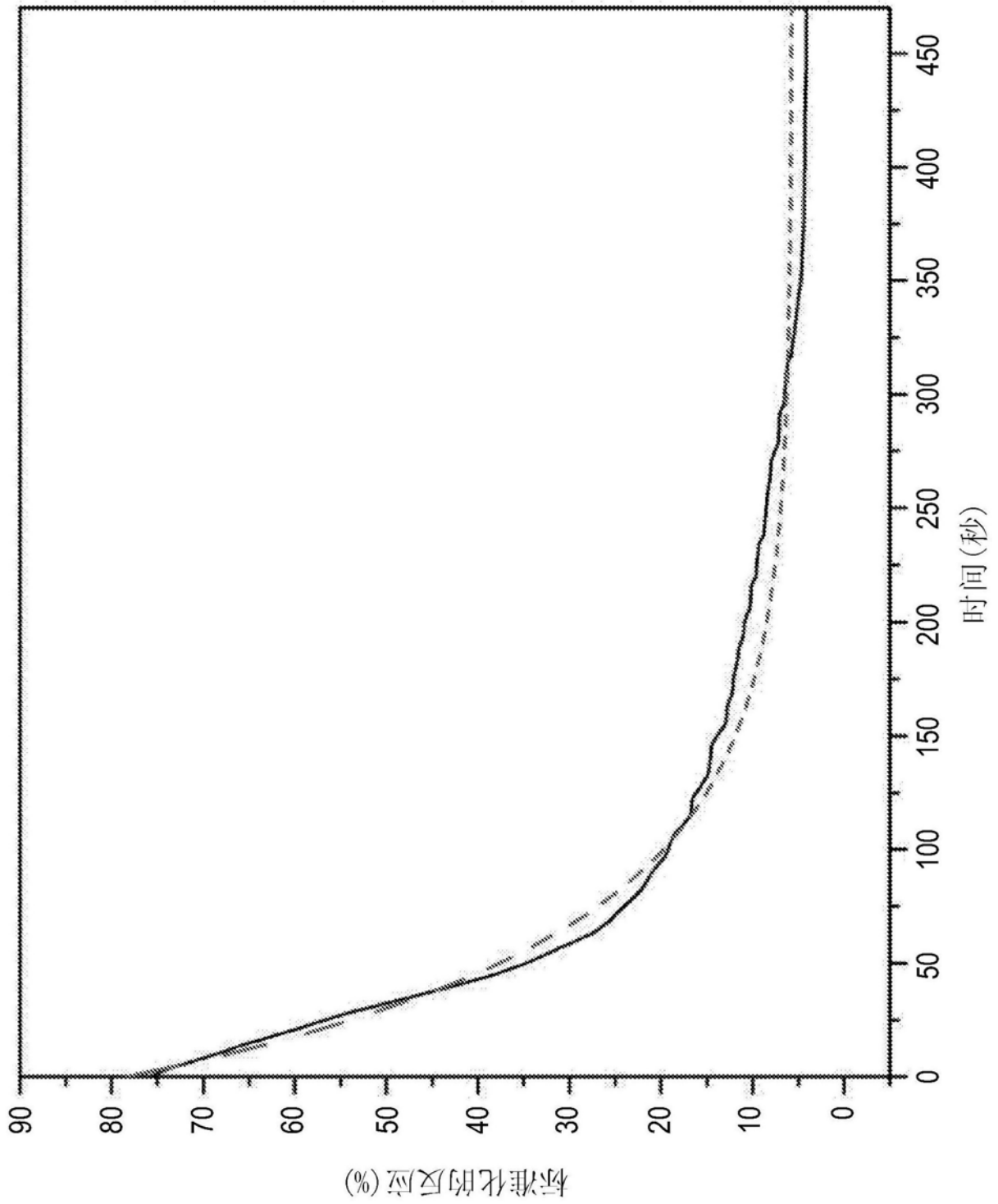


图21

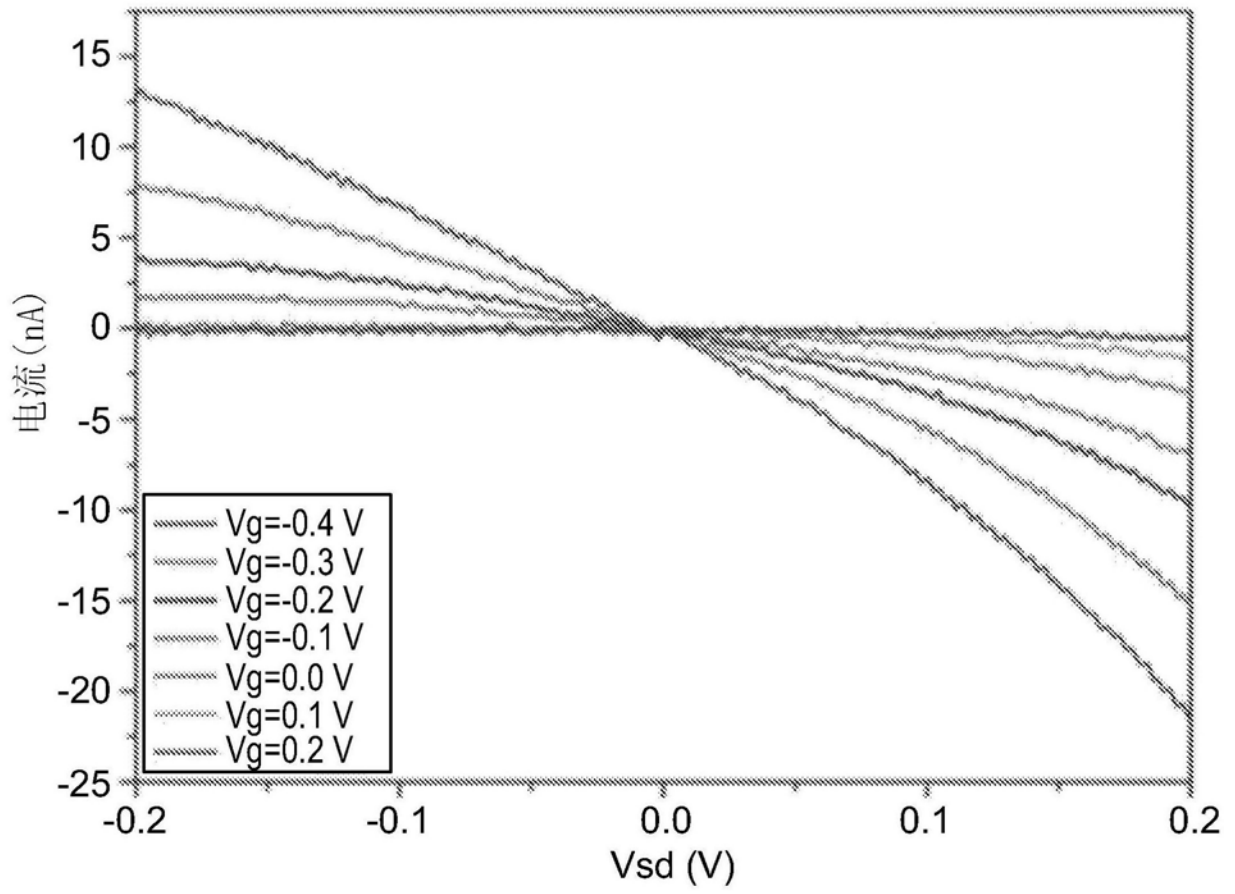


图22A

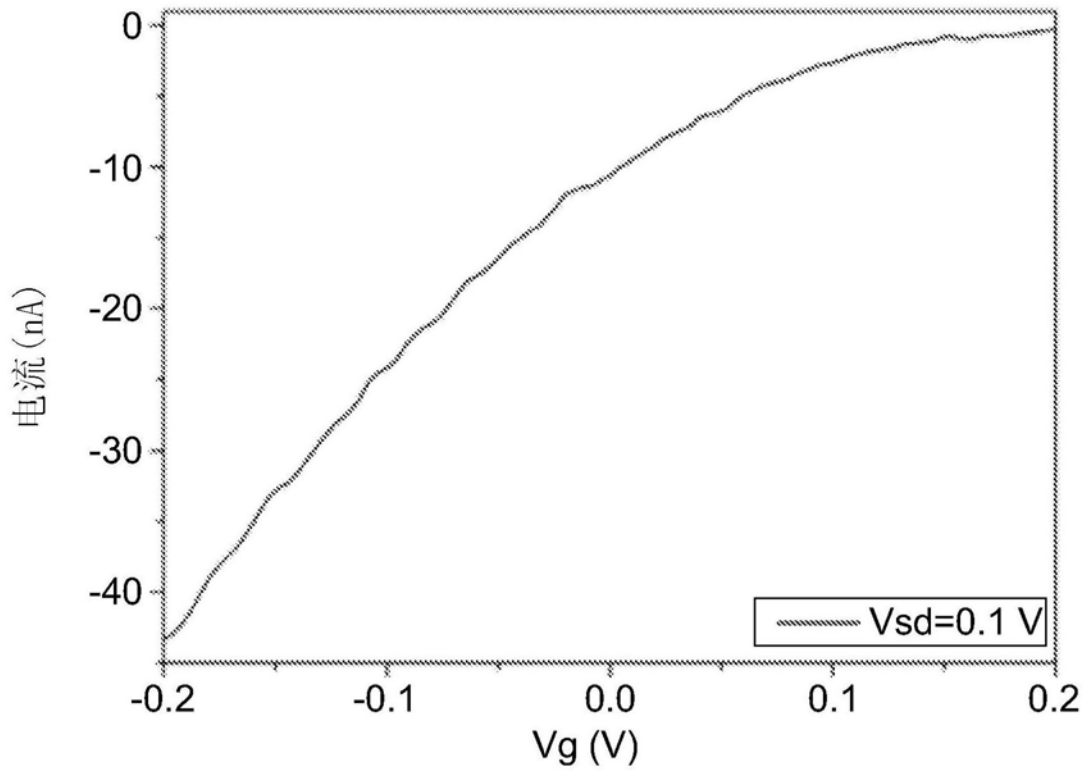


图22B

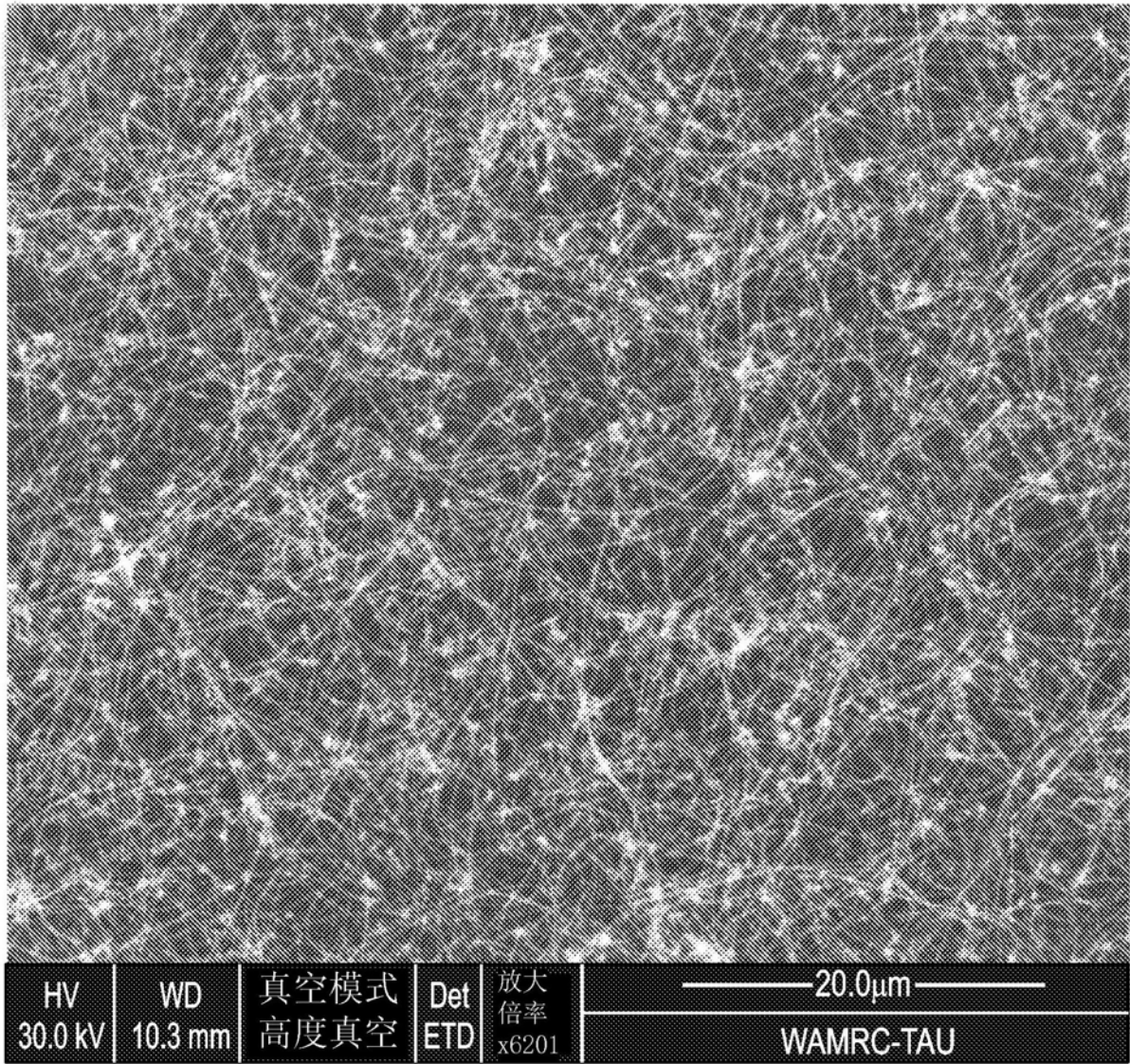


图23A

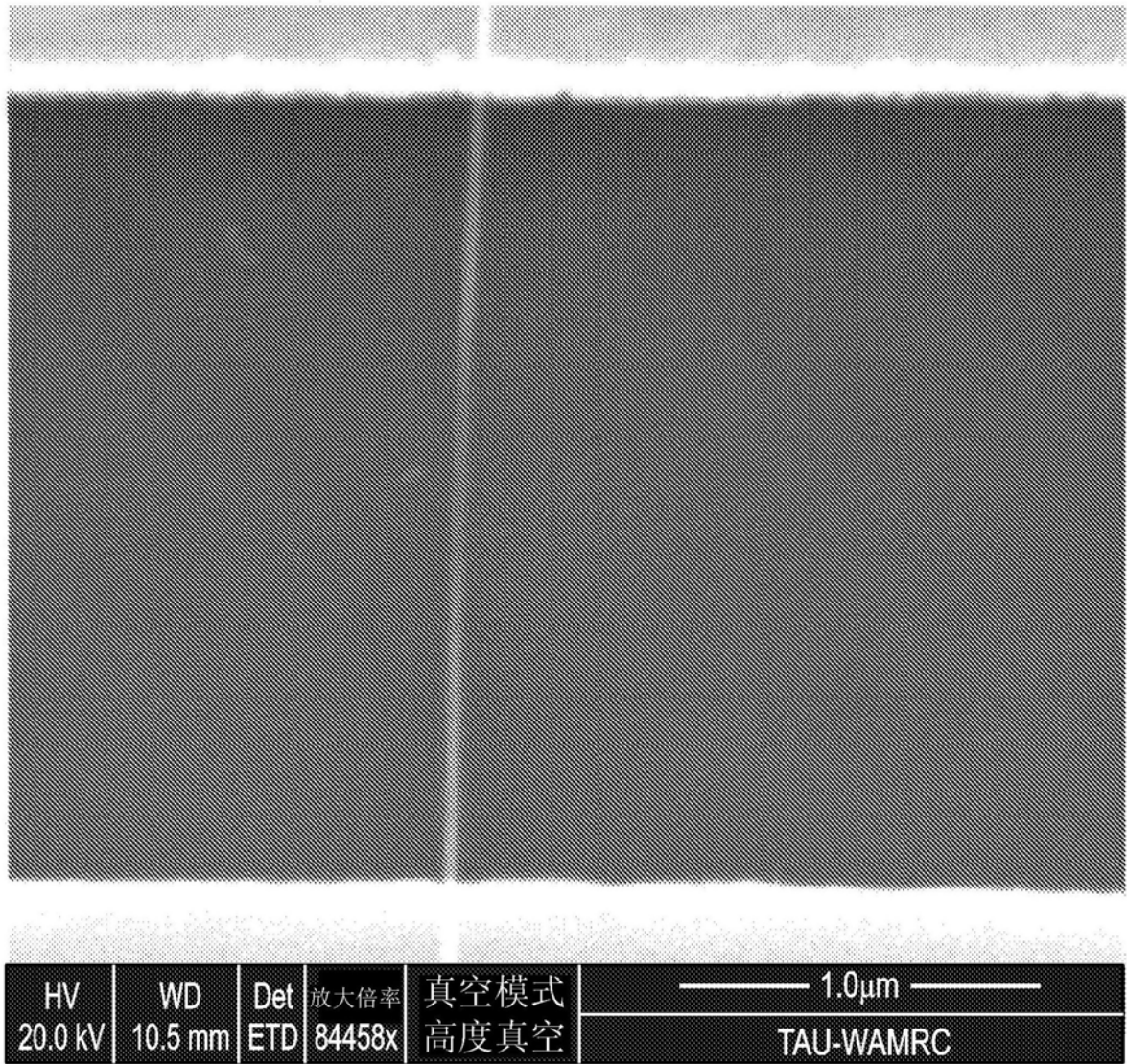


图23B

专利名称(译)	通过修饰的纳米结构进行传感的方法和系统		
公开(公告)号	CN109476477A	公开(公告)日	2019-03-15
申请号	CN201680081327.3	申请日	2016-12-08
申请(专利权)人(译)	拉莫特特拉维夫大学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	拉莫特特拉维夫大学有限公司		
[标]发明人	费尔南多帕托洛斯基 瓦迪姆卡利夫斯基 玛丽娜斯凡辛奈特斯基		
发明人	费尔南多·帕托洛斯基 瓦迪姆·卡利夫斯基 玛丽娜·斯凡辛奈特斯基		
IPC分类号	B82Y10/00 G01N27/327 G01N27/414 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	B82Y15/00 G01N27/4146 G01N33/5005 H01L51/0049 H01L51/0545 H01L51/0558 H01L23/532 H01L29/06 H01L29/0665 A61B5/1473 A61B5/4866 A61B5/6833 A61B5/6847 H01L29/0673 H01L29/16		
代理人(译)	翟羽		
优先权	62/264913 2015-12-09 US 62/264944 2015-12-09 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明揭示一种检测一液体中(例如一液体中)的一标记物(例如标记物)的存在和/或浓度的方法。所述方法包括：使所述液体与一传感器接触，所述传感器具有一固定的亲和性部分，所述亲和性部分与所述标记物相互作用，并且所述传感器配置用以因应于所述相互作用产生一可检测的信号。所述方法进一步包括：将所述液体从所述传感器洗涤去；以及根据在所述洗涤的一开始时间之后于一预定时间段开始的一时间窗口内从所述传感器所接收的一可检测的信号，来检测所述标记物的存在和/或浓度。

