

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00113110.9

[43] 公开日 2002 年 3 月 6 日

[11] 公开号 CN 1338519A

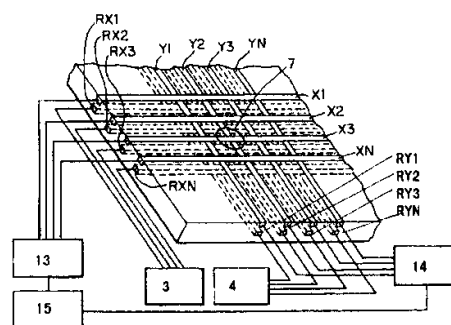
[22] 申请日 2000.8.18 [21] 申请号 00113110.9
 [71] 申请人 莫志宏
 地址 400044 重庆市沙坪坝正街 174 号重庆大学
 科协
 共同申请人 薛永新 靳 萍
 [72] 发明人 莫志宏 薛永新 靳 萍

权利要求书 3 页 说明书 14 页 附图页数 3 页

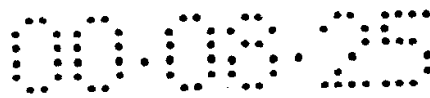
[54] 发明名称 原位生物芯片及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及化学与生物分析仪器。旨在解决已有芯片不能进行原位和实时检测的问题。本芯片包含基片及其上由相同微型传感器构成的传感器阵列,采用在一个传感器上固定一种探针,而有有机化合物、生物分子、细胞、微生物中的至少两种探针构成的检测位点阵列。用于生命科学、医药学、环境科学、生物技术等领域,鉴别有机化合物或生物分子或细胞或微生物或这些物质的混合物,研究发现其生物功能,寻找筛选具有生物功能的物质。



ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1、原位生物芯片，包含有 SiO_2 膜层(5)的基片(1)，其特征在于在 SiO_2 膜层上有沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线和沿 Y 坐标轴的 N 条 Y 地址线相交错，有在 X 地址线和 Y 地址线的交错部的 MN 个能盛装样品溶液(6)的检测池(12)，M、N 为正整数，X 地址线和 Y 地址线的一端分别与各检测池的两个电极(9、10)相连，另一端分别与 X 寻址逻辑电路(13)和 Y 寻址逻辑电路(14)相连，X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路与检测电路(15)相连，构成 MN 个传感器，组成传感器阵列，在一个传感器上固化一种探针(16)形成有至少一种探针的探针阵列，构成 MN 个检测位点(7)，组成检测位点阵列。

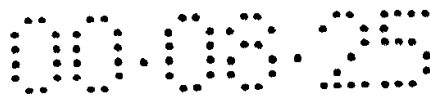
2、根据权利要求 1 所述的原位生物芯片，其特征在于在 SiO_2 膜层(5)下的基片(1)上，有分别与沿 X 坐标轴的 M 条 RX 地址线和沿 Y 坐标轴的 N 条 RY 地址线相连的 X 电阻和 Y 电阻(2)构成的与传感器阵列相对应的电阻阵列，M、N 为正整数，RX 地址线和 RY 地址线的另一端分别与 X 电阻逻辑电路(3)和 Y 电阻逻辑电路(4)相连。

3、根据权利要求 1 所述的原位生物芯片，其特征在于所说的检测位点(7)有至少一个圆孔形的检测池(12)，检测池的孔壁上有金属化层(20)，所说的两个电极(9、10)分别在孔壁的金属化层上，检测池的底面(18)和/或电极的表面呈波纹状。

4、根据权利要求 2 所述的原位生物芯片，其特征在于所说的检测位点(7)有至少一个相互平行的槽形的检测池(12)，所说的电极呈指状，有至少一根位于检测池上层的电极(8)和至少一根位于检测池下层的电极(9)，在上层的电极与 SiO_2 膜层(5)之间依次有粘接层(10)和 Si_3O_4 掩膜层(11)，在下层的电极与 SiO_2 膜层之间有粘接层(10)，检测池的底面(18)和/或电极的表面呈波纹状。

5、根据权利要求 1、2、3 或 4 所述的原位生物芯片，其特征在于所说的探针(16)是有机化合物探针、或生物分子探针、或细胞探针、或微生物探针，探针固化在检测池(13)内的电极(9、10)表面上、或固化在检测池内的固体支撑物上。

6、根据权利要求 1、2、3 或 4 所述的原位生物芯片，其特征在于所说



的 X 寻址逻辑电路(13)、Y 寻址逻辑电路(14)、检测电路(15)集成在基片(1)上。

7、根据权利要求 2 或 4 所述的原位生物芯片，其特征在于所说的 X 电阻逻辑电路(3)、Y 电阻逻辑电路(4)、X 寻址逻辑电路(13)、Y 寻址逻辑电路(14)、检测电路(15)集成在基片(1)上。

8、原位生物芯片的制备方法，其特征在于

1) 制作基片(1)，

2) 在基片上用大规模集成电路技术制作微型传感器阵列，

(1) 在基片(1)上制出沿 X 坐标轴的 M 条 RX 地址线和沿 Y 坐标的 N 条 RY 地址线，及分别与 RX 地址线和 RY 地址线相连的 X 电阻和 Y 电阻(2)构成的电阻阵列，RX 地址线和 RY 地址线的另一端分别与 X 电阻逻辑电路(3)、和 Y 电阻逻辑电路(4)相连，

(2) 采用化学汽相沉积法，在电阻阵列上制出 SiO_2 膜层(5)，在 SiO_2 膜层上，制出沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线和沿 Y 坐标轴的 N 条 Y 地址线，然后在 SiO_2 膜层上制出 Si_3O_4 掩膜层(11)，

(3) 采用光刻法制出电极图形，再采用反应离子腐蚀法，按电极图形腐蚀去除 Si_3O_4 掩膜层(11)制出位于 X 地址线和 Y 地址线交错部的由各相互平行的槽形的穴孔(17)组成的穴孔组，

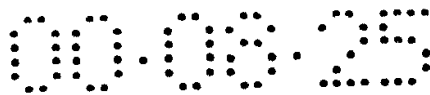
(4) 采用酸性缓冲液湿法腐蚀 SiO_2 膜层(5)，将各穴孔(17)制出凹入的底面(18)，

(5) 采用电子束蒸发法，分别在各底面(18)的 SiO_2 膜层(5)表面、和各余留 Si_3O_4 掩膜层(11)的表面，制出通常材料的粘接层(10)，然后在粘接层上制出金属化层，从而分别制得由金属化层形成的呈指状的位于 Si_3O_4 掩膜层上的上层的电极(9)、和位于底面上的下层的电极(10)，制成各检测池(12)；将各上层的电极和下层的电极分别与 X 地址线和 Y 地址线相连，X 地址线和 Y 地址线的另一端分别与 X 寻址逻辑电路(13)和 Y 寻址逻辑电路(14)相连，再将 X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路与检测电路(15)相连，构成各传感器，组成传感器阵列，

3) 在各传感器的电极(9、10)上固化探针(16)，构成各检测位点(7)，组成检测位点阵列，制成本原位生物芯片。

9、原位生物芯片的制备方法，其特征在于

1) 制作基片(1)，



2) 在基片上用大规模集成电路技术制作微型传感器阵列,

(1) 在基片(1)上制出 SiO_2 膜层(5),

(2) 在 SiO_2 膜层(5)上, 制成沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线和沿 Y 坐标轴的 N 条 Y 地址线, 再采用光刻法制出穴孔图形, 采用反应离子腐蚀法腐蚀 SiO_2 膜层, 在各 X 地址线和 Y 地址线的交错部制出圆孔的穴孔(17)组成的穴孔组,

(3) 采用化学汽相淀积法在 SiO_2 膜层(5)上制出多晶硅膜(19),

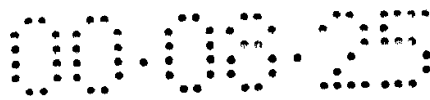
(4) 采用反应离子腐蚀法, 将各穴孔(17)的底面和上表面的多晶硅膜(19)部分腐蚀去除, 保留两侧壁面上的多晶硅膜,

(5) 采用硅化反应将各穴孔(17)的多晶硅膜制成金属化层(20),

(6) 采用化学镀方法, 在各穴孔(17)的金属化层(20)上, 形成在穴孔两侧壁上的 Ni 或 Au 材料的两个电极(9、10), 将各穴孔的底面(18)和电极表面, 制成波纹状, 构成各检测池(12),

(7) 将各检测池内的两个电极(9、10)分别与 X 地址线和 Y 地址线的一端相连, 并将 X 地址线和 Y 地址线的另一端分别与 X 寻址逻辑电路(13)和 Y 寻址逻辑电路(14)相连, 再将 X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路与检测电路(15)相连, 构成各传感器, 组成传感器阵列,

3) 在各传感器的电极(9、10)上固定探针(16), 构成各检测位点(7), 组成检测位点阵列, 制成本原位生物芯片。



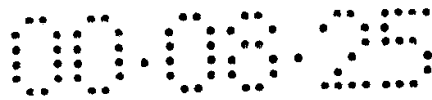
说 明 书

原位生物芯片及其制备方法

本发明属于化学与生物分析仪器技术领域。

目前已有报道的生物芯片主要是采用原位合成法、化学喷射法或接触式点涂法制备的、把寡核苷酸作为探针的基因芯片。如《生物工程进展》1999, Vol. 19(No. 4): 33-37、和 45-51 发表的“生物芯片研究进展”和“基因芯片技术及应用研究进展”两篇文章,综述了国内外对生物芯片技术在加工制备、功能和应用方面的主要研究成果。基因芯片目前主要用于高通量基因表达平行分析、大规模基因发现及序列分析、基因多态性分析和基因组研究等。另外,《Analytical Biochemistry》1994, Vol. 270: 103-111 发表的“用于基因表达和抗体筛选的蛋白质微阵列”一文,首次把蛋白质作为探针高密度地固定在聚双氟乙烯膜上,对 cDNA(反录脱氧核糖核酸)克隆片段表达的产物进行检测。另一方面,目前基因芯片检测主要是利用荧光素等标记目的基因,即所谓荧光标记法。用计算机控制的高分辨荧光扫描仪获得结合于芯片上目的基因的荧光信号进行分析测试。荧光扫描仪主要有灵敏度和分辨率较高、但扫描时间长的激光共聚焦显微镜,和扫描时间短、但灵敏度和分辨率较低的电荷藕合器件(CCD)摄像机两大类。在基因芯片的杂交检测中,为比较不同来源样品的基因表达差异,或者为了提高基因芯片检测的准确性和测量范围,通常需要使用多色荧光技术,如《Nature Genetics》1999, 21(Supplement): 42-47 发表的“采用寡核苷酸微阵列测序和突变分析”文章,把不同来源的靶基因用不同激发波长的荧光探针来修饰,并同时使它们与基因芯片杂交,通过比较芯片上不同波长的分布图,获得不同样品中基因表达的差异。但荧光标记法也存在一些严重的不足,如检测需在杂交反应完成并洗脱未结合标记物后进行,不能对芯片上的反应进行动态监测,因而也不能获取有关反应动力学的信息,同时检测设备复杂且成本高,对检测条件有极其严格的要求,操作冗繁,难以实现自动化、小型化等等。目前还未可进行原位检测的生物芯片技术的报导。

鉴于此,本发明的目的是针对已有生物芯片技术存在的上述问题,提供一种



无须标记、能进行原位检测实时获取微阵列各探针的反应信息，并具有自动、高速、高效，使用简便，相关设备易于微型化、成本低廉的原位生物芯片及其制备方法。

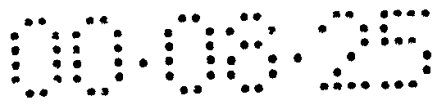
本发明采用在半导体基片上制作结构相同的微型传感器阵列，在每一个传感器上固化一种探针形成在传感器阵列上有有机化合物、生物分子、细胞、微生物中的至少一种探针，形成检测位点阵列，构成在使用时能通过检测预定的检测位点对外加电信号的响应，原位获取该检测位点探针与靶物质的反应信息原位生物芯片来实现其目的；本发明采用大规模集成电路技术在基片上制作微型传感器阵列、并在微型传感器阵列上固化探针制成由检测位点阵列构成的本原位生物芯片来实现其目的。

本发明的原位生物芯片（参见附图），包含有 SiO_2 膜层(5)的基片(1)，在 SiO_2 膜层上有沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线和沿 Y 坐标轴的 N 条 Y 地址线相交错，有在 X 地址线和 Y 地址线的交错部的 MN 个能盛装样品溶液(6)的检测池(12)，M、N 为正整数，X 地址线和 Y 地址线的一端分别与各检测池的两个电极(9、10)相连，另一端分别与 X 寻址逻辑电路(13)和 Y 寻址逻辑电路(14)相连，X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路与检测电路(15)相连，构成 MN 个传感器，组成传感器阵列，在一个传感器上固化一种探针(16)形成至少一种探针的探针阵列，构成 MN 个检测位点(7)，组成检测位点阵列。

在上述 SiO_2 膜层(5)下的基片(1)上，有分别与沿 X 坐标轴的 M 条 RX 地址线和沿 Y 坐标轴的 N 条 RY 地址线相连的 X 电阻和 Y 电阻(2)构成的与传感器阵列相对应的电阻阵列，M、N 为正整数，RX 地址线和 RY 地址线的另一端分别与 X 电阻逻辑电路(3)和 Y 电阻逻辑电路(4)相连。上述 RX 地址线、RY 地址线、X 电阻、Y 电阻 2 构成的电阻阵列，连接 X 电阻逻辑电路 3 和 Y 电阻逻辑电路 4，通过外加电压于 X、Y 电阻交错部分使其发热，用于传感器阵列上探针的定位合成。

上述的检测位点(7)有至少一个圆孔形的检测池(12)，检测池的孔壁上有金属化层(20)，上述的两个电极(9、10)分别在孔壁的金属化层上，检测池的底面(18)和/或电极的表面呈波纹状。

上述的检测位点(7)有至少一个相互平行的槽形的检测池(12)，上述的电极呈指状，有至少一根位于检测池上层的电极(8)和至少一根位于检测池下层的电极(9)，在上层的电极与 SiO_2 膜层(5)之间依次有粘接层(10)和 Si_3O_4 掩膜层(11)，



在下层的电极与 SiO_2 膜层之间有粘接层(10)，检测池的底面(18)和/或电极的表面呈波纹状。

上述的探针(16)是有机化合物探针、或生物分子探针、或细胞探针、或微生物探针，探针固化在检测池(13)内的电极(9、10)表面上、或固化在检测池内的固体支撑物上。

上述的 X 电阻逻辑电路(3)、Y 电阻逻辑电路(4)、X 寻址逻辑电路(13)、Y 寻址逻辑电路(14)、检测电路(15)集成在基片(1)上。

本发明的探针与靶物质的反应可通过在加入靶样品溶液后给检测池内电极施加电压来吸引样品溶液中的靶物质以加快反应速度。没有外加电压时，样品溶液中靶分子只有通过扩散到达探针，这种自由扩散过程效率极低；外加一电压可将带电靶分子直接吸引到联结在电极上的探针，从而加快探针一靶的反应速度。相反，外加一反向电压，则有助于洗脱未反应和错配的靶分子，该技术适用于所有检测位点内置有电极的芯片。另外，可用外加电压产生一冲击电流，用于电极表面的清洗或钝化。

适用于本发明的生物芯片的检测对象即靶物质，可以是无机或有机化合物、生物分子如 DNA（脱氧核糖核酸）、RNA（核糖核酸），抗体或抗-抗体，细胞或微生物。对于不同的靶物质，需选用相对应的探针进行检测，对 RNA 或 DNA 靶物质，探针可以是合成的寡核苷酸。由于一个检测位点上对应有一种探针，而由多个检测位点构成的阵列芯片上对应有由多种探针构成的探针组，因此可对包括相应多种靶物质的靶物质组同时进行检测。当将含有靶物质的样品溶液与本原位生物芯片接触时，被置于在检测位点上构制出的检测池中，靶物质被相应的探针捕获。通过 X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路对每一检测位点进行自动寻址，并通过经 X 地址线、Y 地址线与检测位点相连的检测电路测量该检测位点的电参数，探针一靶的相互作用将导致检测位点电参数的变化，由此，通过电寻址和电参数测量可对原位生物芯片内每一检测位点上特定的靶物质-探针结合进行动态实时监测，从而实现对靶物质组成的测定。

本发明的原位生物芯片的制备方法如下：

1) 制作基片(1)，

2) 在基片上用大规模集成电路技术制作微型传感器阵列，

(1) 在基片(1)上制出沿 X 坐标轴的 M 条 RX 地址线和沿 Y 坐标的 N 条 RY

地址线，及分别与 RX 地址线和 RY 地址线相连的 X 电阻和 Y 电阻(2)构成的电阻阵列，RX 地址线和 RY 地址线的另一端分别与 X 电阻逻辑电路(3)、和 Y 电阻逻辑电路(4)相连，

(2) 采用化学汽相淀积法，在电阻阵列上制出 SiO_2 膜层(5)，在 SiO_2 膜层上，制出沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线和沿 Y 坐标轴的 N 条 Y 地址线，然后在 SiO_2 膜层上制出 Si_3O_4 掩膜层(11)，

(3) 采用光刻法制出电极图形，再采用反应离子腐蚀法，按电极图形腐蚀去除 Si_3O_4 掩膜层(11)制出位于 X 地址线和 Y 地址线交错部的由各相互平行的槽形的穴孔(17)组成的穴孔组，

(4) 采用酸性缓冲液湿法腐蚀 SiO_2 膜层(5)，将各穴孔(17)制出凹入的底面(18)，

(5) 采用电子束蒸发法，分别在各底面(18)的 SiO_2 膜层(5)表面、和各余留 Si_3O_4 掩膜层(11)的表面，制出通常材料的粘接层(10)，然后在粘接层上制出金属化层，从而分别制得由金属化层形成的呈指状的位于 Si_3O_4 掩膜层上的上层的电极(9)、和位于底面上的下层的电极(10)，制成各检测池(12)；将各上层的电极和下层的电极分别与 X 地址线和 Y 地址线相连，X 地址线和 Y 地址线的另一端分别与 X 寻址逻辑电路(13)和 Y 寻址逻辑电路(14)相连，再将 X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路与检测电路(15)相连，构成各传感器，组成传感器阵列，

3) 在各传感器的电极(9、10)上固化探针(16)，构成各检测位点(7)，组成检测位点阵列，制成本原位生物芯片。

本发明的原位生物芯片的制备也可以是如下的方法：

1) 制作基片(1)，

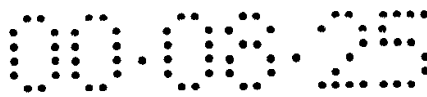
2) 在基片上用大规模集成电路技术制作微型传感器阵列，

(1) 在基片(1)上制出 SiO_2 膜层(5)，

(2) 在 SiO_2 膜层(5)上，制成沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线和沿 Y 坐标轴的 N 条 Y 地址线，再采用光刻法制出穴孔图形，采用反应离子腐蚀法腐蚀 SiO_2 膜层，在各 X 地址线和 Y 地址线的交错部制出圆孔的穴孔(17)组成的穴孔组，

(3) 采用化学汽相淀积法在 SiO_2 膜层(5)上制出多晶硅膜(19)，

(4) 采用反应离子腐蚀法，将各穴孔(17)的底面和上表面的多晶硅膜(19)部分腐蚀去除，保留两侧壁面上的多晶硅膜，



(5) 采用硅化反应将各穴孔(17)的多晶硅膜制成金属化层(20),

(6) 采用化学镀方法, 在各穴孔(17)的金属化层(20)上, 形成在穴孔两侧壁上的 Ni 或 Au 材料的两个电极(9、10), 将各穴孔的底面(18)和电极表面, 制成波纹状, 构成各检测池(12),

(7) 将各检测池内的两个电极(9、10)分别与 X 地址线和 Y 地址线的一端相连, 并将 X 地址线和 Y 地址线的另一端分别与 X 寻址逻辑电路(13)和 Y 寻址逻辑电路(14)相连, 再将 X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路与检测电路(15)相连, 构成各传感器, 组成传感器阵列,

3) 在各传感器的电极(9、10)上固定探针(16), 构成各检测位点(7), 组成检测位点阵列, 制成本原位生物芯片。

本发明的生物芯片, 通过采用微电子、微机械、化学处理、生物操纵等制备工艺和过程, 得到多个作为探针的有机分子、或生物分子、或细胞、或微生物的微阵列, 能使成千上万个与生命或药物相关的信息集成在一块厘米见方的芯片上。

本发明的与已有生物芯片及其制备方法相比较, 具有如下的明显优点和显著效果。

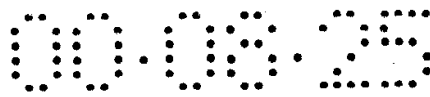
一、本发明采用微型传感器, 可以通过测量探针-靶结合所致的一种电信号或频率变化(频移), 原位、实时直接检测探针-靶的相互作用, 并可揭示相互作用的动态机制。探针或靶无须偶联荧光素等标记物, 只有当结合反应的电信号或频移极小或不存在时, 可用带电分子标记靶。

二、本发明采用的现有微电子技术可在 1cm^2 芯片上作出上百万个密度均匀、性能统一的微型化检测位点阵列, 其成本廉价, 可与标准电子器件相当, 而且这种微型传感器阵列具有比其它方法更高的灵敏度和准确性。

三、本发明的原位生物芯片, 可以采用电子检测方法, 由于是测量电信号随频率的变化, 不存在传感器阵列幅值特性受靶样品溶液腐蚀的影响, 因此本发明芯片可重复使用多次而不影响精度; 而且芯片还可涂敷获得更长的使用寿命。

四、本发明将执行检测位点定位和检测的电路集成在芯片上的结构, 使开关、信号处理和电源也都可以集成在同一芯片上, 实现检测系统的集成化、微型化、自动化, 而且使用简便, 同时, 可大批量生产, 大大降低成本。

五、本发明的微型检测位点阵列结构, 使用时由于一是不存在对未结合标



记物的清洗，二是无须标记而减少了样本制备时间，三是只要有足够的结合量使电信号或频移有明显变化而无须等待反应完成，四是采用微处理器控制本芯片可提供超高速阵列定位测量，因此可大大缩短检测时间。

六、本发明采用有机化合物、生物分子、细胞、微生物中的至少一种作为探针组成探针阵列，能同时捕捉、检测与多种探针相互作用的靶物质，不限于现有生物芯片采用寡核苷酸探针仅应用于DNA序列测定，还可应用于同时鉴别多种特定有机化合物或生物分子或识别它们的混合物，寻找筛选具有生物作用的有机化合物或生物分子或细胞或微生物或它们的混合物，寻找发现有机化合物或生物分子或细胞或微生物或这些物质混合物的生物功能。

本发明的生物芯片配用于化学与生物分析仪器，并借助已有的检测技术，应用于鉴别有机化合物或生物分子或它们的混合物，研究发现有有机化合物或生物分子或细胞或微生物的生物功能，寻找、筛选、分离、鉴定具有生物功能的有机化合物或生物分子或细胞或微生物或这些物质的混合物。可以进行生命科学、医学和药学中所涉及的各种生物化学反应及其检测，从而获取有关目标(靶)组分的成分、结构、性状、功能的一维或多维信息。以生物芯片为核心构建的生物化学和药物分析仪具有以下一些主要优点，分析全过程自动化、生产成本低、芯片可一次性使用避免污染、分析速度可获得成千上万倍的提高、所需样品量可获得成百上千倍的减少、极高的多样品处理能力、仪器体积小、重量轻、便于携带等。生物芯片技术可广泛应用于疾病诊断和治疗、药物筛选、农作物的优育优选、司法鉴定、食品卫生监督、环境检测、国防、航天等许多领域，它将为人类认识生命的起源、遗传、发育与进化、为人类疾病的诊断、治疗和防治开辟全新的途径，为生物大分子的全新设计和药物开发中先导化合物的快速筛选和药物基因组学研究提供技术支撑平台。

下面，再用实施例及其附图对本发明作进一步地说明。

附图的简要说明。

图1 是本发明的一种原位生物芯片的结构示意图。

图2 是图1中一个检测位点部的放大图。

图3 是图2中电极部分的放大图。

图4 是图3A-A局部的剖视图。图中30为电场。

图5A-5D 是一种检测位点的主要制作步骤的示意图。

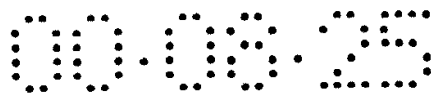


图 6A-6H 是另一种检测位点的主要制作步骤的示意图。

图 7 是结合检测位点(曲线 A)和未结合检测位点(曲线 B)的损耗因子(D)与频率对数($\log f$)的关系图。

图 8 是一种采用波地址线的检测位点平面示意图。

图 9 是一种采用输入-频率范围为 $f_1 - f_2$ 的交流电压 V_i 的检测位点及其检测系统示意图。

图 10 是图 9 所示检测位点测试系统导纳(G_{AC})与输入的电压 V_i 频率(f)的关系图。

图 11 是幅值不变、频率从低(f_1)到高频(f_2)的输入电压(V_i) - 时间(time)图。

图 12 是检测位点对图 11 所示输入电压(频率由低频 f_1 到高频 f_2)响应的输出电压(V_o) - 时间(time)图。

图 13 是检测位点对图 11 所示输入电压(频率由高频 f_2 到低频 f_1)响应的输出电压(V_o) - 时间(time)图。

图 14 是一种微机械谐振器式的检测位点示意图。

图 15 是一种声表面波检测系统的示意图。

实施例 1

本发明的一种原位生物芯片,如图 1-5 所示。由基片及其上的检测位点阵列构成。

上述的基片 1,呈平片形。

在基片 1 上,如图 1 所示,有与沿 X 坐标轴的 M 条 RX 地址线即 RX1、RX2、RX3...RXM 地址线,和沿 Y 坐标轴的 N 条 RY 地址线即 RY1、RY2、RY3...RYN 地址线相连的 X 电阻和 Y 电阻 2 构成的电阻阵列,上述 M、N 为正整数,各 RX 地址线和各 RY 地址线的一端分别与 X 电阻和 Y 电阻 2 相连,另一端分别与通常的 X 电阻逻辑电路 3 和 Y 电阻逻辑电路 4 相连,用于探针的定位合成。在电阻阵列上覆有一层 SiO_2 膜层 5。 SiO_2 膜层上有与电阻阵列相对应的由沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线即 X1、X2、X3...XM 地址线,和沿 Y 坐标轴的 N 条 Y 地址线即 Y1、Y2、Y3...YN 地址线相交错,上述 M、N 为正整数。在 X 地址线和 Y 地址线的 MN 交错部是 MN 个能盛装样品溶液 6 的检测位点 7。检测位点中的电极,如图 3、4 所示,有至少一根呈指状条形的位于上层的电极 8,和至少一根呈指状条形的位于下层的电极 9。在电极 8 与 SiO_2 膜 5 之间依次有粘接层 10 和 Si_3O_4 掩膜层 11,在电极



9 与 SiO_2 膜 5 之间有粘接层 10。多根电极 8 和多根电极 9 平行相间构成叉指状的电极组。在检测位点中的相邻的两根上层的电极 8 与其间的下层的电极 9 之间构成检测池 12，从而在检测位点中形成多个检测池。上述 X 地址线和 Y 地址线的一端分别与电极 8 和电极 9 相连、另一端分别与通常的 X 寻址逻辑电路 13 和 Y 寻址逻辑电路 14 相连。X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路与通常的检测电路 15 相连构成多个传感器，组成与上述电阻阵列相对应的传感器阵列。在一个传感器中的检测池内的电极上固化一种探针 16，传感器阵列中各传感器中的探针构成探针阵列，在探针阵列中可以有有机化合物探针、生物分子探针、细胞探针、微生物探针中的至少一种。从而组成检测位点阵列。上述 X 电阻逻辑电路 3、Y 电阻逻辑电路 4、X 寻址逻辑电路 13、Y 寻址逻辑电路 14、检测电路 15 均集成在基片 1 上。

本发明的上述原位生物芯片的制备方法如下。

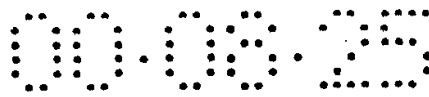
1) 上述的基片 1，采用绝缘或半导体材料和通常的方法制成平片形，使用的材料可以是单晶硅、玻璃、石英、刚玉片等。

2) 在基片上用大规模集成电路技术制作微型传感器阵列。

(1) 在基片 1 上蒸镀或溅射电阻材料如镍铬合金、钨或铂金属制出沿 X 坐标轴的 M 条 RX 地址线即 RX1、RX2、RX3...RXM 地址线，和沿 Y 坐标的 N 条 RY 地址线即 RY1、RY2、RY3...RYN 地址线，及分别与 RX 地址线和 RY 地址线相连的 X 电阻和 Y 电阻 2 构成的电阻阵列，如图 1 所示。电阻 2 还可通过一些成熟技术如化学汽相淀积 (CVD)，分子束外延 (MBE)，金属有机 CVD (MOCVD) 或其它半导体工艺，用掺杂多晶硅、钨或钼或铂的硅化物或氮化物或氮氧化物制成。RX 地址线和 RY 地址线的另一端分别与集成在基片上的通常的 X 电阻逻辑电路 3、和 Y 电阻逻辑电路 4 相连。

(2) 采用化学汽相淀积法，在电阻阵列上制出厚度约 5000\AA (埃) 的 SiO_2 膜层 5，继而在 SiO_2 膜层上，制出沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线即 X1、X2、X3...XM 地址线，和沿 Y 坐标轴的 N 条 Y 地址线即 Y1、Y2、Y3...YN 地址线，然后在 SiO_2 膜层上采用掩膜材料 Si_3O_4 制出厚度约 500\AA 的 Si_3O_4 掩膜层 11。

(3) 采用光刻法制出电极图形，再采用反应离子腐蚀法，按电极图形腐蚀去除 Si_3O_4 掩膜层 11 制出位于 X 地址线和 Y 地址线 MN 个交错部的由多个相互平行的槽形的宽约 $2\ \mu\text{m}$ 长条形的穴孔 17 组成的穴孔组，如图 5B 所示。



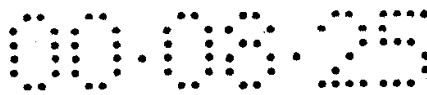
(4) 采用酸性缓冲液如 HF 缓冲液湿法腐蚀深度约 4000Å SiO_2 膜层 5, 将各穴孔 17 制出凹入的底面 18, 如图 5C 所示。

(5) 采用电子束蒸发法, 分别在各穴孔的底面 18 的 SiO_2 膜层 5 表面、和各余留 Si_3O_4 掩膜层 11 的表面, 制出厚度约 300Å 的粘接层 10, 然后在粘接层上制出金材料的厚度约 2000Å 的金属化层, 分别制得位于 Si_3O_4 掩膜层 12 上的由金属化层形成的电极 8、和位于底面 18 上的电极 9, 构成由多个指状条形的电极 8 和电极 9 相间构成的叉指状的电极组。各穴孔的底面和/或各电极表面, 可以制成波纹状表面, 这种纹理构形使检测位点的表面积增大, 从而可固定更多的探针以获得更高的灵敏度。如图 3 所示的一组叉指状电极长约 100 μm 、宽约 100 μm , 各电极为宽约 2 μm 的长条形, 各电极间距约 2 μm 。这种叉指设计可使其在基片上极小的区域内有较大的与样品接触的电极表面积, 从而具有较高的“样品”电容与检测位点电极引线所致寄生电容的比值。将各电极 8 和电极 9 分别与各 X 地址线和 Y 地址线相连, X 地址线和 Y 地址线的另一端分别与集成在基片 1 上的 X 寻址逻辑电路 13 和 Y 寻址逻辑电路 14 相连, 再将 X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路与集成在基片 1 上的检测电路 15 相连, 构成 MN 个传感器, 组成传感器阵列, 图 5A-5D 给出的只是基片 1 的一部分上的一个检测位点 7。采用现代半导体技术, 可在一直径 3 英寸的基片上加工出 700 万个以上这样的检测位点。

3) 在检测位点上固定探针

在检测位点上的探针是根据欲测的靶物质确定, 可采用不同的探针, 包括寡核苷酸、单或双链 DNA 或 RNA 抗体或抗原-抗体复合物、肿瘤细胞以及其它任何可与靶物质互相结合的物质。如对 RNA 或 DNA 靶物质, 探针可以是合成的寡核苷酸。在一个检测位点上对应有一种探针, 由多个检测位点构成的阵列芯片上对应有由多种探针构成的探针组。本发明采用有机化合物、生物分子、细胞、微生物中的至少一种作为探针组合成微阵列, 同时捕捉、检测与多种探针相互作用的靶物质。即可对包括相应的多种靶物质的靶物质组同时进行检测。

如图 4 所示, 本发明的探针 16 直接固定在检测位点 7 中的检测池 12 内的电极 8 和电极 9 上。探针也可固定在固体支撑物 (图中未显示) 上, 在使用时将固体支撑物连同探针放入检测池 12 内。固体支撑物, 可以是有机或无机物基体, 如玻璃、聚苯乙烯、聚亚酰胺、二氧化硅以及氮化硅。固定探针的固体支撑物或电极需预先功能化以产生有利于与所选探针共价连接的表面化学。例如, 当选用



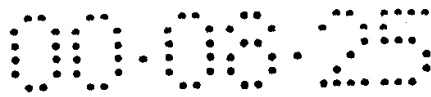
玻璃作固定支撑物时,可通过与环氧硅烷反应使其环氧基功能化,在玻璃上的环氧基与 5'-氨基-衍生寡核苷酸探针反应,形成一仲胺共价联接,而将探针联接至玻璃的表面。如 5' 醛或羧酸、氨基和磷酸的衍生物可分别与酰肼、重氮化活化以及氨基修饰的聚苯乙烯结合。在固定探针的电极的表面也需预处理覆层上能与探针直接结合的材料,这些材料包括金、氧化铌、氧化铍、铂、钛、钽、钨及其它金属,这些金属表面能通过与其探针上的有机巯基连接形成稳定的偶合物。如一 5' 或 3' 端标记上巯基的合成 DNA 探针可与金等金属形成稳定的偶合物。

探针的固定可在合成各种探针后,采用微量移液管或微喷头或针头将各种探针逐点分布在基片表面各相应的检测位点上。固定探针的方法有如下几种。

(1) 点样固定探针法: 探针通过前述表面化学固定于由金或 SiO_2 或其它材料构成的检测位点上。这种点样法适合于制备低密度(每厘米约 100 个以下探针)的探针阵列。

(2) 原位合成探针法: 直接在相应检测位点上合成固定各探针。探针的原位合成法是基于组合化学的合成原理。它通过一组定位模板来决定基片表面上不同化学单体的偶联位点和次序,如由四组 16 块模板定位合成得到 256 个不同的四核苷酸探针阵列。第一组中四个模板的阴影部分分别对应于基片上四个不同位置,通过不同的模板把腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸嘧啶(A、C、G、T)四种不同碱基的核苷酸化学偶联在相应的阴影区内。第二组模板相对于第一组旋转 90°,同样的方法在上一层碱基上分别偶联上四种碱基。在第二组合成结束时,在基片上共制备得 16 种不同的二核苷酸。第三、四组模板把上面的模板图形进行细分,重复第一、二组的合成方法,可以产生 256 个不同的四核苷酸探针阵列。随着模板图形细分次数 n 的增加,芯片上可产生 4^{2n} 种 $2n$ 个碱基的寡核苷酸探针。目前,已有多种模板技术用于 DNA 探针的原位合成,如光去保护并行合成法、光刻胶保护合成法、微流体模板固相合成技术、分子印章多次压印合成法等。原位合成法也可用于固相基片上钛或其它大分子探针的合成,可以发挥微细加工技术的优势,很适合制作大规模探针阵列芯片,实现高密度芯片的标准化和规模化生产。

(3) 探针定位合成法: 本发明是通过图 1-4 中电阻 2,在不影响相邻检测位点的情况下加热芯片的设定检测位点,进行探针的定位合成。通过对所选电阻施加电压,该检测位点将原位热活化探针如寡核苷酸链的合成。并且,可对除与



合成反应检测池相邻以外的所有电阻加一大电流，以使非合成检测池的温度保持在合成所需温度以上，避免该检测池内发生合成反应。同样，本发明自动定位传感器阵列可通过对其中设定检测位点的电极施加电压，在该检测池内进行定位电致或电催化合成反应。

而且，对其中设定检测位点的电极施加电压还可用于吸引检测池内样品溶液中的反应物以加快反应速度。如探针与靶分子的杂交反应可通过在加入靶样品溶液后给电极施加电压来加快反应，没有外加电压时，样品溶液中靶分子只有通过扩散到达探针，由于这种扩散过程效率极低，通常需要 1.5 到 2 小时才有明显的反应，而且还有大部分没有反应的探针。外加一电压可将带电靶分子直接吸引到联结在电极上的探针，从而加快反应速度，并提高靶/探针反应的数量。相反，外加一反向电压，则有助于洗脱未反应和错配的靶分子，该技术适用于所有检测位点内置有电极的芯片。另外，可用外加电压产生一冲击电流，用以电极表面的清洗或钝化。

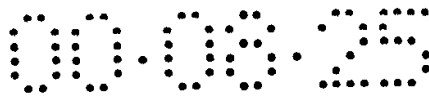
实施例 2

本发明的一种原位生物芯片，如图 6A-6H 所示，由基片及其上的检测位点阵列构成。参见图 1，本实施例可保留或去除图 1 中的 RX1、RX2、RX3...RXM 地址线、RY1、RY2、RY3...RYN 地址线、X 电阻逻辑电路 3、Y 电阻逻辑电路 4。

上述的基片 1，与实施例 1 相同。在基片上覆有一层 SiO_2 膜层 5。在 SiO_2 膜层上有由沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线即 X1、X2、X3...XM 地址线和沿 Y 坐标轴的 N 条 Y 地址线即 Y1、Y2、Y3...YN 相交错。在 X 地址线和 Y 地址线的 MN 交错部有与 X 地址线和 Y 地址线相连的检测位点，上述 M、N 为正整数。各检测位点有多个能盛装样品溶液 6 的凹入呈圆孔形的检测池 12，。在各检测池 12 的孔壁上覆有多晶硅膜 19，在多晶硅膜上覆有金属化层 20，金属化层上有电极 8 和电极 9，检测池 12 的底面 18 和/或电极呈波纹形表面。本实施例的传感器、探针等的结构与实施例 1 相同。

本发明的上述原位生物芯片的制备方法如下。

- 1) 制作基片。采用的材料和方法与实施例 1 相同。
- 2) 在基片上用大规模集成电路技术制作微型传感器阵列。
 - (1) 在基片 1 上制出厚度约 5000 Å 的 SiO_2 膜层 5。
 - (2) 在 SiO_2 膜层 5 上，制成沿 X 坐标轴的 M 条 X 地址线和沿 Y 坐标轴的



N 条 Y 地址线, 再采用光刻法制出穴孔图形, 采用反应离子腐蚀法腐蚀 SiO_2 膜层, 在各 X 地址线和 Y 地址线的 MN 个交错部制出凹入的圆孔形的穴孔 17, 组成穴孔阵列。各穴孔的孔深约 $0.5 \mu\text{m}$ 、孔径约 $2 \mu\text{m}$ 、孔间距 $2 \mu\text{m}$ 。

(3) 采用化学汽相沉积法在 SiO_2 膜层 5 上制出厚度约 2000\AA 的多晶硅膜 19。

(4) 采用反应离子腐蚀法, 将各穴孔 17 的底面和上表面的多晶硅膜 19 部分腐蚀去除, 保留孔壁上的多晶硅膜。

(5) 用 W 或 Ti 或 Pt 材料, 采用硅化反应将各穴孔 17 的孔壁的多晶硅膜金属化, 制成金属化层 20,

(6) 采用化学镀方法, 在各孔壁的金属化层 20 上, 形成 Ni 或 Au 材料的电极 8 和电极 9, 构成各检测池 12, 组成检测池阵列。也可以将各穴孔的底面和/或各电极表面, 制成波纹状表面。

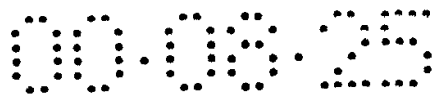
(7) 将各检测池的电极 8 和电极 9 分别与各 X 地址线和 Y 地址线的一端相连, 并将 X 地址线和 Y 地址线的另一端分别与用通常方法集成在基片 1 上的通常的 X 寻址逻辑电路 13 和 Y 寻址逻辑电路 14 相连, 再将 X 寻址逻辑电路和 Y 寻址逻辑电路与通常的检测电路 15 相连, 构成各传感器, 组成传感器阵列。

(8) 在各传感器的电极上, 固定探针 16。组成检测位点阵列。

3) 在检测位点上固定探针的方法与实施例 1 相同。

使用本发明的原位生物芯片, 如实施例 1 和实施例 2 的原位生物芯片对靶物质进行检测的传感检测有两大类型: 一类是基于检测位点两电极间的介质损耗、或是交流导纳(阻抗)或是传输线射频损耗的变化; 另一类是基于用作检测位点的微谐振器的谐振频率或品质因子(Q)的变化。在检测过程中本发明的原位生物芯片有机化合物探针、生物分子探针、细胞探针、微生物探针中的至少一种组合成探针微阵列, 可同时捕捉、检测与多种探针相互作用的靶物质。

使用本发明的原位生物芯片的电学杂交检测方法: 本发明的原位生物芯片可作为基因传感器阵列用于检测各检测位点 7 是否存在靶基因。在 DNA 解码检测应用中, 在每一检测位点上固定大量的较短寡核苷酸链的探针 16, 探针链的一端与检测位点表面相连。对一传感器阵列, 各检测位点连有不同编码序列的探针链, 而每一检测位点上所有探针链的编码序列则是相同并且已知的。当在本发明的芯片的检测位点的检测池中注入含有未知(靶)DNA 长链的样品溶液 6 时, 在理

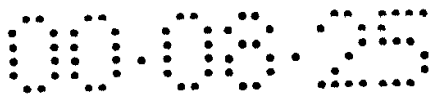


想情况下，靶 DNA 将只在含与其密码序列部分互补序列的检测位点上与寡核苷酸链的探针紧密结合，而不与其它任何检测位点结合；实际上，往往会存在某些较弱的 DNA 错配，但这些错配可通过在适当的离子浓度和温度下采用适当的样品溶液清洗检测池予以消除。因此，清洗后芯片上许多检测池将含有结合成杂交的 DNA，另外余下的检测池则仍只含有原寡核苷酸链探针。通过每个检测位点的电极 8 和 9 依序电讯问各检测池，可找到并记录下含有杂交 DNA 的检测位点。当检测位点上有无杂交 DNA 时，其电性质将有明显不同。如在 DNA 分子的谐振频率下。前者样品溶液介电常数约是后者的 10-100 倍。下述检测方法 (2)-(5) 即是基于检测各检测位点变化而设计的。由此数据库，通过“迭代”或“神经网络”算法重构出靶 DNA 的完整编码序列。

(1) 损耗因子法：图 7 是结合 DNA (曲线 B) 与未结合 DNA (曲线 A) 的损耗因子 - 频率对数图，该图表明两者损耗因子 (D) 随频率 (f) 的变化明显不同，由此，可用于确定检测位点上是否存在杂交 DNA。损耗因子的检测可采用十分成熟的仪器方法如阻抗仪，测量仪表通过 X 寻址逻辑电路 13 和 Y 寻址逻辑电路 14 依序与各检测位点 7 接通。

(2) 交流电导法：各检测位点上是否存在杂交 DNA 也可通过测量交流电导进行检测，交流电导 $G_{ac} = \epsilon A / d$ ，式中 ϵ 电极间介质的介电常数、A 为电极的有效面积、d 为电极间的有效距离。对一 DNA 分子样品溶液，在其弛豫频率下，其交流电导是无 DNA 液的 100 倍以上。图 9 是该方法的原理示意图，在各检测位点 7 的电极 8 和 9 间施加一脉冲或频率扫描波，在每一电极上有探针 16，在检测位点的检测池 12 中加有靶分子样品溶液。如图 10 所示，检测到在某一频率 (DNA 谐振频率) 下 G_{ac} 出现极大，表明存在杂交 DNA。可用阻抗仪在某一频率下测量电导 G_L 或电阻 R_L ($R_L = 1/G_L$)，也可如前对图 9、10 的说明，在一定的频率范围测量电导与频率的关系。

(3) 传输 - 损耗检测法：在一传输线上信号损耗也对电极间介质的介电常数 ϵ 的变化敏感。如图 8 的一种采用波地址线的检测位点平面示意图所示，在各检测位点 X 地址线和 Y 地址线间引入一传输线 21，在每一检测位点 7，可通过分级测量 - 通过传输线的电磁波的射频损耗，来完成 DNA 等杂交分子的电检测。传输线可由一微型的条形线、微带、波导管、共面波导管、缝隙线或共轴线构成。为使该法有较高的灵敏度，检测池 12 要比图 4 中的检测池宽或长，而且检测池



内的传输线采取曲折的形式使其具有最大的长度。

(4) 线性调频脉冲检测法: 如图 11 所示, 在每一检测位点的两电极间施加一频率扫描或电压调制波形 V_i , 所得响应波形 V_o 示于图 12 或图 13, 图中在某频率(杂交 DNA 频率)下, 输出电压 V_o 达到极大, 表明有杂交 DNA 的存在。采用频率扫描波形测量杂交 DNA 的弛豫频率可得到有关杂交 DNA 性质的某些信息, 如交联与非交联。

(5) 微机械谐振器检测法: 本法中, 如图 14 所示, 在基片 1 中制成一组由谐振器构成的检测位点。该谐振器由电极膜结构的置于上层的电极 8 和置于下层的电极 9 及其中间的谐振腔(介质一般为空气)22 构成, 电极 9 的材料为金属, 在基片 1 平面上沿 X 方向延伸, 电极 8 的材料为氮化硅或金属钽, 沿 Y 方向延伸, 电极的尺寸一般为直径或宽/长 $100\mu\text{m}$ 。在电极 8 上构制有一检测池 12, 在池内的电极 8 的表面固定探针 16, 靶 DNA 的样品溶液 6 置于检测池内。电极 8 可采用 CVD 技术沉积一氮化硅薄膜, 并可通过控制硅氮比和蒸发温度调节室温下膜的张力, 可先在基片 1 上沉积氮化硅薄膜后, 在基片无膜的一侧 23 腐蚀出一窗口形成检测池 12。该谐振器的谐振频率在数千赫兹到数兆赫兹间, 有极狭小的谐振线宽。当一射频信号施加到谐振器时, 将产生一高品质因子 Q 值、窄线宽的响应。在谐振器的电极 8 表面上的杂交分子将使其 Q 值或谐振频率发生变化。

(6) 声波或电磁波检测法: 也可采用表面波如表面声波(SAW)或表面电磁波器件构制成类似的谐振阵列检测器。如图 15 所示, SAW 检测器的谐振结构 24 由一声学换能器 25 和一 SAW 反射器 26 构成, 换能器可采用在铌酸锂晶体或石英晶体基体 27 上蒸镀叉指结构的铝薄膜, 反射器可采用一铝薄膜光栅, 这些图形结构可采用标准的光刻和蒸镀技术加工制作。由源 28 发射的一频率扫描波 W 通过声介质的基体, 反射器反回的反射波 W' 通过检测池 12, 采用仪表 29 测量换能器的能量损耗。从而检测由反射器感应的离散腔谐振。在介质上构制检测位点 7, 每一检测位点可有一对应的换能器和反射器, 或用在此基体上构制的一个多位开关将所有检测位点与一个换能器相连。检测位点上形成靶/探针对将改变其谐振频率, 由此可检测出有结合探针的检测位点。另外, 经过检测位点后的 SAW 波相位可用传输线与基体中的参比传输线相比, 由此测量表面结合反应引起的相位变化, 也可用来测定有结合分子的检测位点。

说明书附图

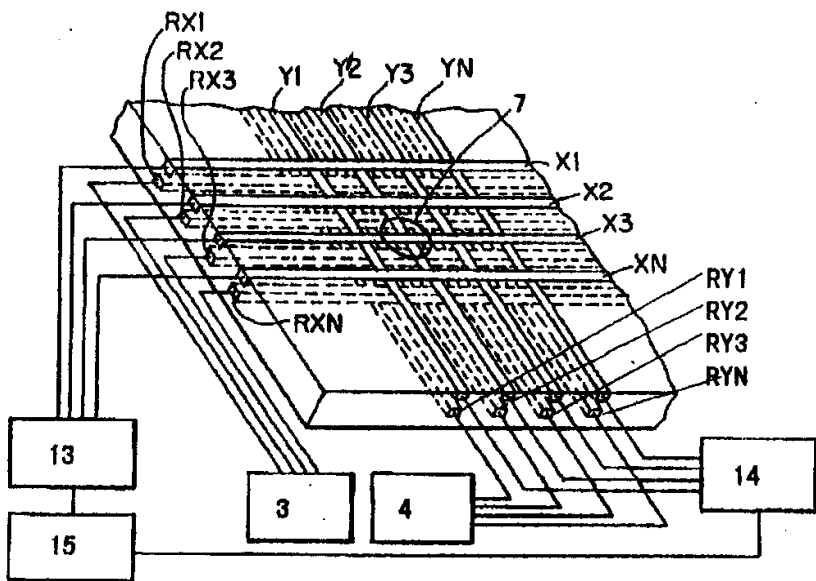


图 1

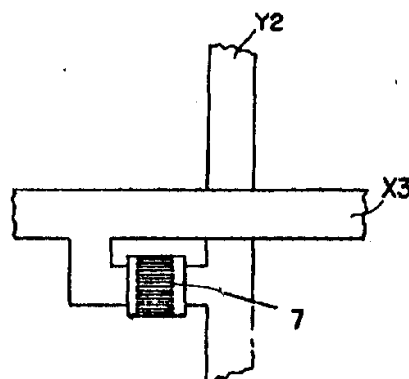


图 2

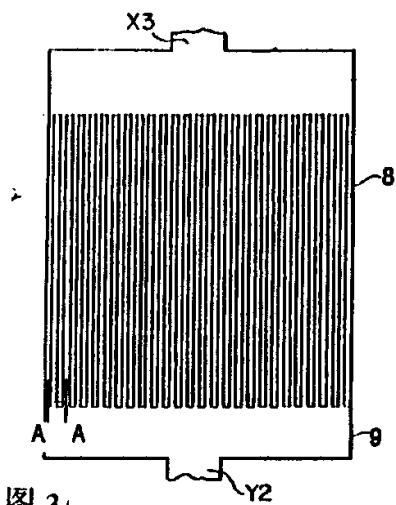


图 3

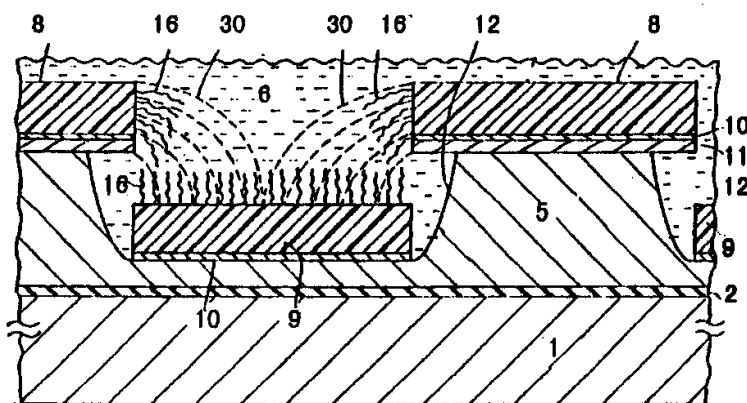


图 4

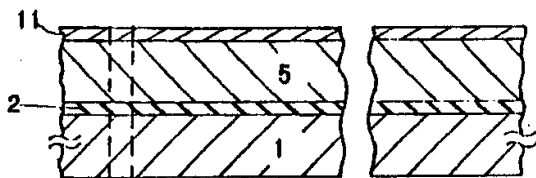


图 5A

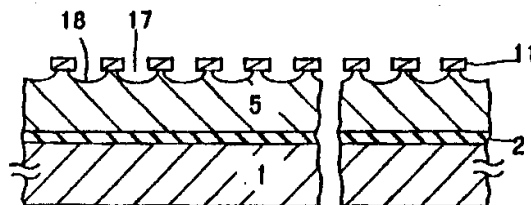


图 5C

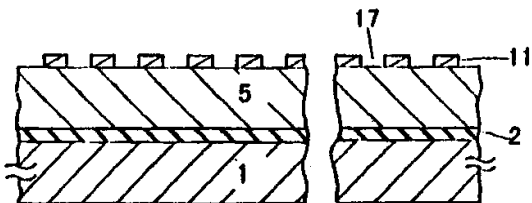


图 5B

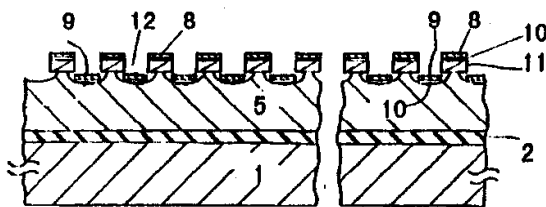


图 5D

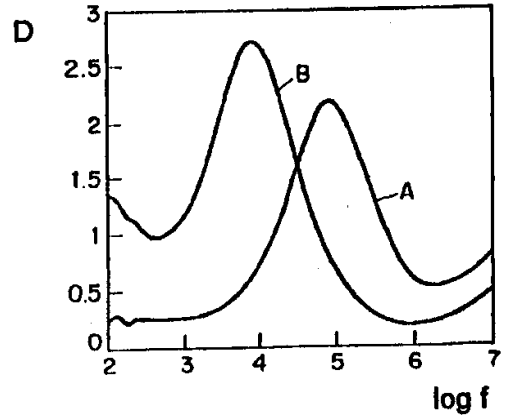
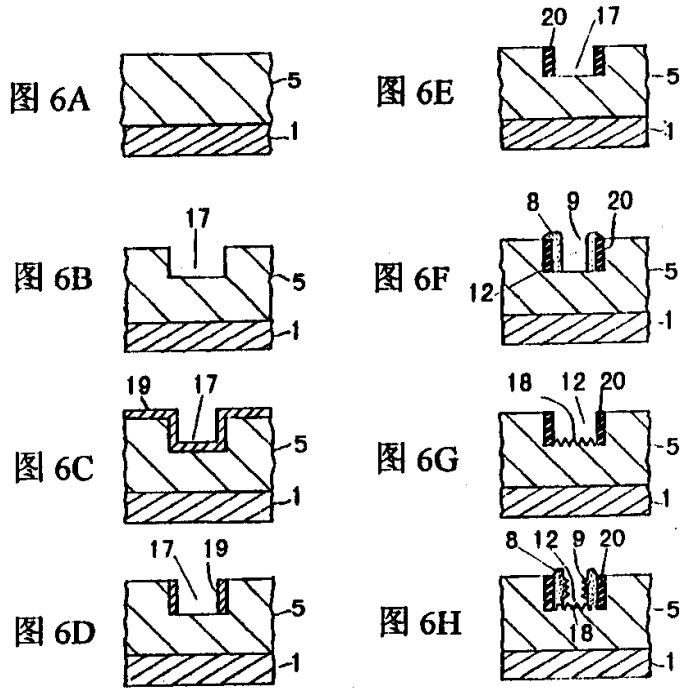


图 7

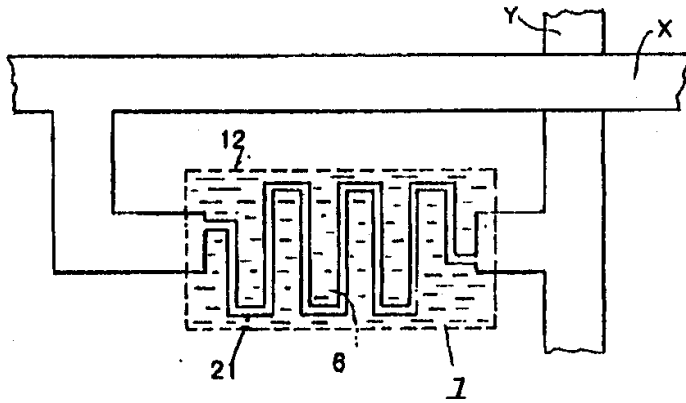


图 8

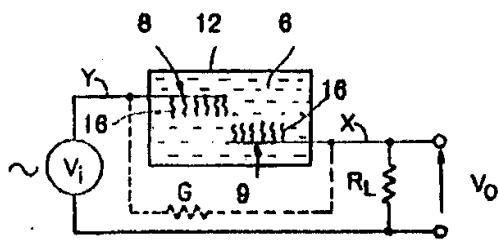


图 9

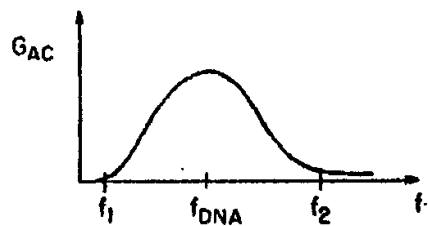


图 10

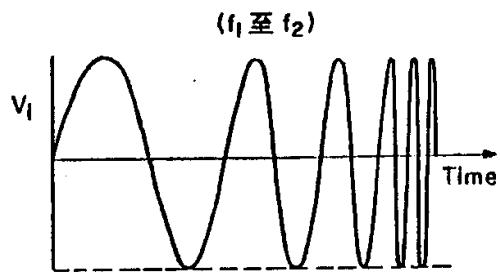


图 11

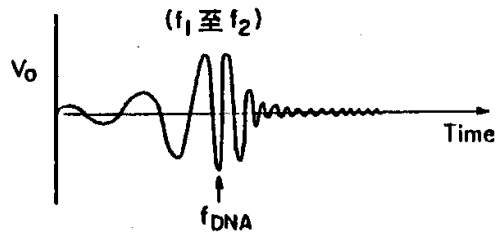


图 12

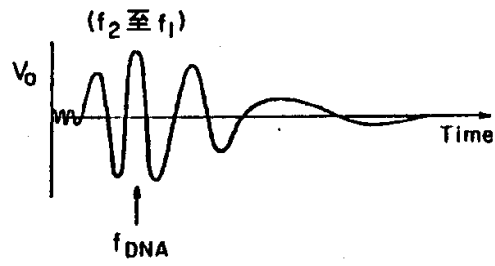


图 13

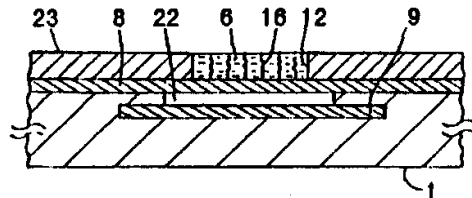


图 14

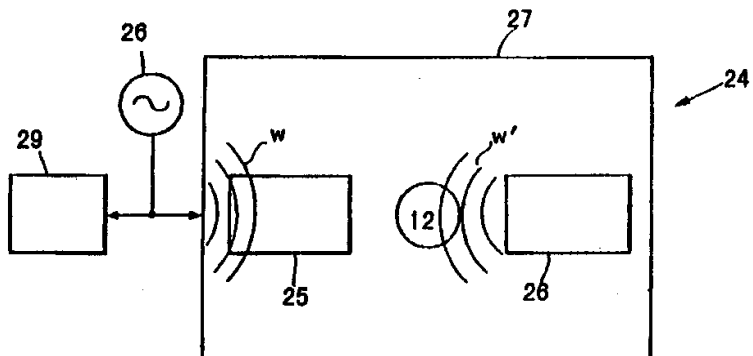


图 15