



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111440855 A

(43)申请公布日 2020.07.24

(21)申请号 202010266327.9

(22)申请日 2020.04.07

(71)申请人 中国科学院重庆绿色智能技术研究院

地址 400714 重庆市北碚区方正大道266号

(72)发明人 王德强 何石轩 周大明

(74)专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 杨柳岸

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6869(2018.01)

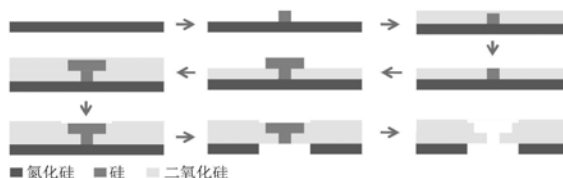
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

## (54)发明名称

近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法

## (57)摘要

本发明涉及一种近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法,属于纳米技术领域。该方法包括以下步骤:S1:近零厚度纳米孔制备;S2:近零厚度纳米孔DNA单碱基识别。本发明基于近零厚度纳米孔具有亚纳米孔的高空间分辨率,而且可以通过大规模半导体的生产工艺来实现,所以其具有很强的创新性和实用性,能够极大地推动基于纳米孔的DNA测序技术和蛋白质检测技术开发,有着很大的基础研究价值和潜在的实际应用前景。



1. 近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

S1:近零厚度纳米孔制备;

S2:近零厚度纳米孔DNA单碱基识别。

2. 根据权利要求1所述的近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法,其特征在于:所述S1具体为:

准备好氮化硅绝缘薄膜衬底;

利用电子束光刻技术,采用灰化工艺或侧墙工艺在氮化硅绝缘薄膜上形成硅纳米线,硅纳米线的尺寸将决定纳米孔的大小;其中,硅纳米线的厚度10-20纳米,宽度为5-10纳米,长度为50纳米-200纳米;

然后,在形成了硅纳米线的氮化硅绝缘薄膜上生长一层二氧化硅薄膜,将硅纳米线覆盖住,二氧化硅薄膜厚度15-25纳米;利用化学机械抛光法将硅纳米线曝露出来;

在暴露出来的硅纳米线垂直方向,利用前述电子束光刻技术形成第二层硅纳米线;其中,该硅纳米线的厚度10-20纳米,宽度为5-10纳米,长度为50纳米-200纳米;在其上生长一层二氧化硅,覆盖在硅纳米线上;

接着,使用光学或电子束光刻在芯片上端硅纳米线区域形成一个通气孔;使用反应离子刻蚀在底部的氮化硅薄膜上开一个窗口,窗口大小为10-20微米;

最后,利用二氟化氙 $\text{XeF}_2$ 将两层硅纳米线刻蚀掉,制作完成近零厚度的纳米孔。

3. 根据权利要求1所述的近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法,其特征在于:所述S2具体为:

利用制备好的近零厚度纳米孔,集成纳米孔检测器件,优选缓冲液浓度、PH值、溶液温度和驱动电压,采用膜片钳技术,实现DNA在近零厚度纳米孔传输时的弱电流信号检测,并利用化学计量学方法,提取DNA传输特征信息,结合贝叶斯推理、神经网络方法,实现DNA单碱基的识别。

4. 根据权利要求3所述的近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法,其特征在于:所述DNA传输特征信息包括阻塞时间、阻塞电流和基线电流。

## 近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米技术领域,涉及近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法。

### 背景技术

[0002] DNA (Deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸) 序列因其蕴含生物体遗传信息,被喻为生命的“蓝图”。正确解读DNA序列中的遗传信息,对人类健康和疾病诊断、生命探索、分子育种等领域具有重要意义。因此,发展准确、快速、低成本、高通量和高精度的DNA测序技术,能够帮助人们加深对生物体遗传信息的解读和有效利用。

[0003] 到目前为止,DNA测序已经历了三代技术变革。最早使用的DNA测序方法是双脱氧核苷酸链终止法(桑格法)。此外,边合成边测序的二代测序技术和利用零模波导的单分子第三代测序技术涌现出来,但是还不能够满足日益增长的个人医疗需求。纳米孔测序法是第四代DNA测序的主流技术之一,主要包含生物纳米孔和固体纳米孔。理论上,A、T、C、G四种不同的碱基化学性质的差异会导致它们穿越纳米孔时引起的电学参数的变化量也不同,通过这些变化得到相应碱基的类型。与其他方法相比,由于纳米孔测序不需要对DNA进行生物或化学处理,可以采用物理办法直接读出DNA序列,而且具有低成本、长读长、易集成等优点而备受关注。潜在地和大规模半导体工艺技术相结合,有可能将成本降到100美元以下,就能够完成一个人的基因组序列测试。由于脂双层膜和生物纳米孔的尺寸固定以及制作大规模阵列困难等因素,限制了生物纳米孔在更广泛领域和极端条件下的使用。在2001年,在氮化硅薄膜上,哈佛大学物理系JeneGolovchenko课题组通过能量为3KeV的氦离子束完成直径为1.8纳米的固体纳米孔。由于固体纳米孔能够克服上述生物纳米孔的缺点,并且还能够在潜在地和大规模半导体生产工艺相结合,形成规模化生产,进一步降低生产的成本。

[0004] 然而,固态纳米孔的灵敏度和空间分辨率主要依赖于纳米孔的大小和厚度,当前人们研究了具有原子层厚度的石墨烯、氮化硼和二硫化钼纳米孔,它们具有很高的灵敏度和0.5纳米的理论空间分辨率,而且在二硫化钼纳米孔系统中已经展现单个碱基的分辨能力,但是这几种薄膜材料非常的脆弱,不宜操作,需要通过手动的方法(透射电子显微镜,聚焦氦离子束)来制作完成,在它们上面形成的纳米孔重复性不高,效率低,速度慢;并且由于材料的稳定性和重复性等方面的不足,不能够满足规模化生产和实际应用的需求。并且由于材料在液体环境下的稳定性和重复性等方面的不足,纳米孔的孔径随着时间的变化而且也在逐渐地增大。因此,纳米孔DNA测序面临着如何提高纳米孔测量DNA的灵敏度和空间分辨率来识别单个碱基问题。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法。

[0006] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] 近零厚度纳米孔制备及DNA测序方法,该方法包括以下步骤:

[0008] S1:近零厚度纳米孔制备;

[0009] S2:近零厚度纳米孔DNA单碱基识别。

[0010] 可选的,所述S1具体为:

[0011] 准备好氮化硅绝缘薄膜衬底;

[0012] 利用电子束光刻技术,采用灰化工艺或侧墙工艺在氮化硅绝缘薄膜上形成硅纳米线,硅纳米线的尺寸将决定纳米孔的大小;其中,硅纳米线的厚度10-20纳米,宽度为5-10纳米,长度为50纳米-200纳米;

[0013] 然后,在形成了硅纳米线的氮化硅绝缘薄膜上生长一层二氧化硅薄膜,将硅纳米线覆盖住,二氧化硅薄膜厚度15-25纳米;利用化学机械抛光法将硅纳米线曝露出来;

[0014] 在暴露出来的硅纳米线垂直方向,利用前述电子束光刻技术形成第二层硅纳米线;其中,该硅纳米线的厚度10-20纳米,宽度为5-10纳米,长度为50纳米-200纳米;在其上生长一层二氧化硅,覆盖在硅纳米线上;

[0015] 接着,使用光学或电子束光刻在芯片上端硅纳米线区域形成一个通气孔;使用反应离子刻蚀在底部的氮化硅薄膜上开一个窗口,窗口大小为10-20微米;

[0016] 最后,利用二氟化氙XeF<sub>2</sub>将两层硅纳米线刻蚀掉,制作完成近零厚度的纳米孔。

[0017] 可选的,所述S2具体为:

[0018] 利用制备好的近零厚度纳米孔,集成纳米孔检测器件,优选缓冲液浓度、PH值、溶液温度和驱动电压,采用膜片钳技术,实现DNA在近零厚度纳米孔传输时的弱电流信号检测,并利用化学计量学方法,提取DNA传输特征信息,结合贝叶斯推理、神经网络方法,实现DNA单碱基的识别。

[0019] 可选的,所述DNA传输特征信息包括阻塞时间、阻塞电流和基线电流。

[0020] 本发明的有益效果在于:

[0021] 本发明基于规模化加工方式实现具有亚纳米高空间分辨率的纳米孔及其DNA传输特性研究,这种结构是由上下两个纳米量级的沟道相互垂直构成,中间交叉的区域为纳米孔的有效区域。分子动力学理论模拟指出通过该结构的离子电流仅仅和外加电压、纳米孔的大小有关,对厚度没有太大的依赖性,所以我们称为近零厚度纳米孔,有效厚度趋近于零,而且还有单层石墨烯和二硫化钼纳米孔相类似的特性,具有亚纳米的空间分辨率,可以开展DNA通过零厚度纳米孔的传输特性实验研究。同时,由于近零厚度纳米孔具有亚纳米孔的高空间分辨率,而且可以通过大规模半导体的生产工艺来实现,所以其具有很强的创新性和实用性,能够极大地推动基于纳米孔的DNA测序技术和蛋白质检测技术开发,有着很大的基础研究价值和潜在的实际应用前景。

[0022] 本发明的其他优点、目标和特征在某种程度上将在随后的说明书中进行阐述,并且在某种程度上,基于对下文的考察研究对本领域技术人员而言将是显而易见的,或者可以从本发明的实践中得到教导。本发明的目标和其他优点可以通过下面的说明书来实现和获得。

## 附图说明

[0023] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明作优选的详细描述,其中:

[0024] 图1为近零厚度纳米孔制备工艺流程图;

[0025] 图2为近零厚度纳米孔的3D结构图和截面图示意图;图2(a)为近零厚度纳米孔的3D整体效果图,中间的白色部分为纳米孔的有效区域;(b)为沿着红线BB的截面图;(c)为沿着黑线CC的截面图。

### 具体实施方式

[0026] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。需要说明的是,以下实施例中所提供的图示仅以示意方式说明本发明的基本构想,在不冲突的情况下,以下实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0027] 其中,附图仅用于示例性说明,表示的仅是示意图,而非实物图,不能理解为对本发明的限制;为了更好地说明本发明的实施例,附图某些部件会有省略、放大或缩小,并不代表实际产品的尺寸;对本领域技术人员来说,附图中某些公知结构及其说明可能省略是可以理解的。

[0028] 本发明实施例的附图中相同或相似的标号对应相同或相似的部件;在本发明的描述中,需要理解的是,若有术语“上”、“下”、“左”、“右”、“前”、“后”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系,仅是为了便于描述本发明和简化描述,而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此附图中描述位置关系的用语仅用于示例性说明,不能理解为对本发明的限制,对于本领域的普通技术人员而言,可以根据具体情况理解上述术语的具体含义。

[0029] 图1为近零厚度纳米孔制备工艺流程图;图2为近零厚度纳米孔的3D结构图和截面图示意图;图2(a)为近零厚度纳米孔的3D整体效果图,中间的白色部分为纳米孔的有效区域;(b)为沿着红线BB的截面图;(c)为沿着黑线CC的截面图。

[0030] 本发明提供如下技术方案:

[0031] 1. 近零厚度纳米孔制备

[0032] 准备好氮化硅绝缘薄膜衬底;

[0033] 利用电子束光刻技术,采用灰化工艺或侧墙工艺在氮化硅绝缘薄膜上形成硅纳米线,硅纳米线的尺寸将决定纳米孔的大小。其中,硅纳米线的厚度10-20纳米,宽度为5-10纳米,长度为50纳米-200纳米;

[0034] 然后,在形成了硅纳米线的氮化硅绝缘薄膜上生长一层二氧化硅薄膜,将硅纳米线覆盖住,二氧化硅薄膜厚度15-25纳米;利用化学机械抛光法将硅纳米线曝露出来;

[0035] 在暴露出来的硅纳米线垂直方向,利用前述电子束光刻技术形成第二层硅纳米线;其中,该硅纳米线的厚度10-20纳米,宽度为5-10纳米,长度为50纳米-200纳米;同样地,在其上生长一层二氧化硅,覆盖在硅纳米线上;

[0036] 接着,使用光学或电子束光刻在芯片上端硅纳米线区域形成一个通气孔;使用反应离子刻蚀在底部的氮化硅薄膜上开一个窗口,窗口大小为10-20微米;

[0037] 最后,利用二氟化氙( $XeF_2$ )将两层硅纳米线刻蚀掉,制作完成近零厚度的纳米孔;

[0038] 2. 近零厚度纳米孔DNA单碱基识别方法

[0039] 利用制备好的近零厚度纳米孔,集成纳米孔检测器件,优选缓冲液浓度、PH值、溶液温度和驱动电压,采用膜片钳技术,实现DNA在近零厚度纳米孔传输时的弱电流信号检测,并利用化学计量学方法,提取DNA传输特征信息(阻塞时间、阻塞电流、基线电流),结合贝叶斯推理、神经网络方法,实现DNA单碱基的识别。

[0040] 实施例一

[0041] 1. 近零厚度纳米孔制备

[0042] 准备好氮化硅绝缘薄膜衬底;

[0043] 利用电子束光刻技术,采用灰化工艺在氮化硅绝缘薄膜上形成硅纳米线,硅纳米线的尺寸将决定纳米孔的大小。其中,硅纳米线的厚度10纳米,宽度为5纳米,长度为50纳米;

[0044] 然后,在形成了硅纳米线的氮化硅绝缘薄膜上生长一层二氧化硅薄膜,将硅纳米线覆盖住,二氧化硅薄膜厚度15纳米;利用化学机械抛光法将硅纳米线曝露出来;

[0045] 在曝露出来的硅纳米线垂直方向,利用前述电子束光刻技术形成第二层硅纳米线;其中,该硅纳米线的厚度10纳米,宽度为5纳米,长度为50纳米;同样地,在其上生长一层二氧化硅,覆盖在硅纳米线上;

[0046] 接着,使用电子束光刻在芯片上端硅纳米线区域形成一个通气孔;使用反应离子刻蚀在底部的氮化硅薄膜上开一个窗口,窗口大小为10微米;

[0047] 最后,利用二氟化氙( $XeF_2$ )将两层硅纳米线刻蚀掉,制作完成近零厚度的纳米孔;

[0048] 2. 近零厚度纳米孔DNA单碱基识别方法

[0049] 利用制备好的近零厚度纳米孔,集成纳米孔检测器件,优选缓冲液浓度、PH值、溶液温度和驱动电压,采用膜片钳技术,实现DNA在近零厚度纳米孔传输时的弱电流信号检测,并利用化学计量学方法,提取DNA传输特征信息(阻塞时间、阻塞电流、基线电流),结合贝叶斯推理方法,实现DNA单碱基的识别。

[0050] 实施例二

[0051] 1. 近零厚度纳米孔制备

[0052] 准备好氮化硅绝缘薄膜衬底;

[0053] 利用电子束光刻技术,采用侧墙工艺在氮化硅绝缘薄膜上形成硅纳米线,硅纳米线的尺寸将决定纳米孔的大小。其中,硅纳米线的厚度20纳米,宽度为10纳米,长度为200纳米;

[0054] 然后,在形成了硅纳米线的氮化硅绝缘薄膜上生长一层二氧化硅薄膜,将硅纳米线覆盖住,二氧化硅薄膜厚度25纳米;利用化学机械抛光法将硅纳米线曝露出来;

[0055] 在曝露出来的硅纳米线垂直方向,利用前述电子束光刻技术形成第二层硅纳米线;其中,该硅纳米线的厚度20纳米,宽度为10纳米,长度为200纳米;同样地,在其上生长一层二氧化硅,覆盖在硅纳米线上;

[0056] 接着,使用光学光刻在芯片上端硅纳米线区域形成一个通气孔;使用反应离子刻蚀在底部的氮化硅薄膜上开一个窗口,窗口大小为20微米;

[0057] 最后,利用二氟化氙( $XeF_2$ )将两层硅纳米线刻蚀掉,制作完成近零厚度的纳米孔;

[0058] 2. 近零厚度纳米孔DNA单碱基识别方法

[0059] 利用制备好的近零厚度纳米孔,集成纳米孔检测器件,优选缓冲液浓度、PH值、溶

液温度和驱动电压,采用膜片钳技术,实现DNA在近零厚度纳米孔传输时的弱电流信号检测,并利用化学计量学方法,提取DNA传输特征信息(阻塞时间、阻塞电流、基线电流),结合神经网络方法,实现DNA单碱基的识别。

[0060] 综上所述,本发明提供一种近零厚度纳米孔制备技术和基于近零厚度纳米孔的DNA测序方法,实现DNA单碱基的识别。

[0061] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

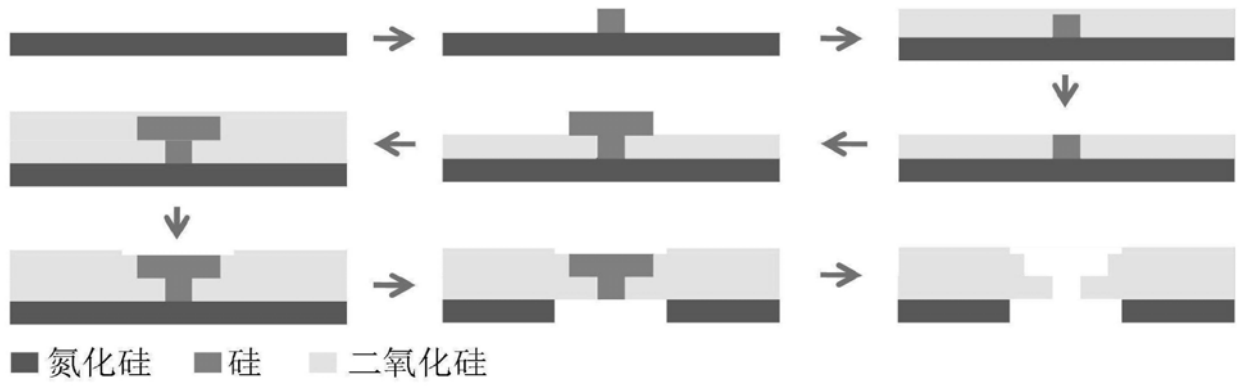
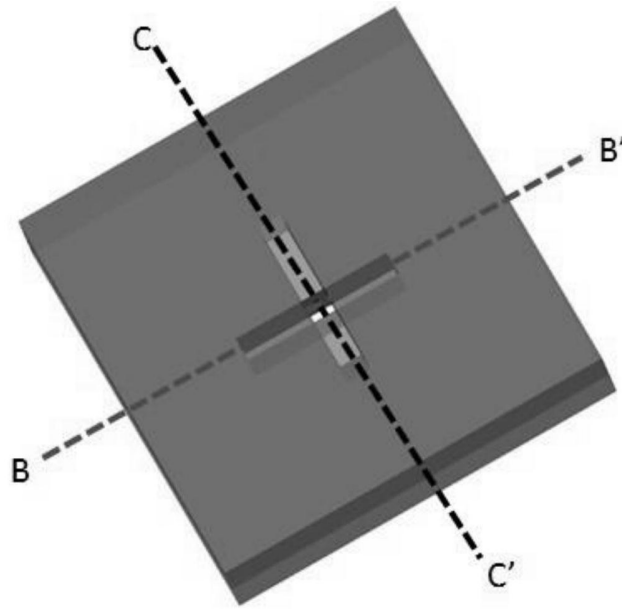
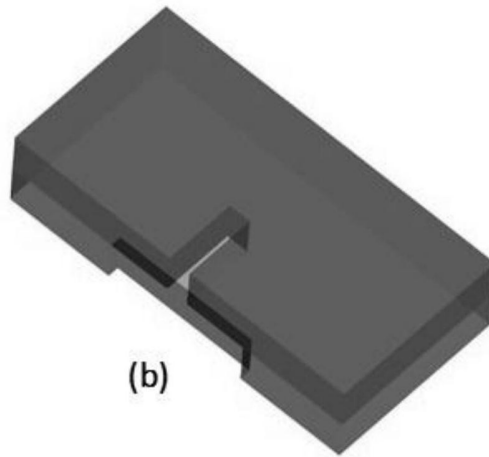


图1

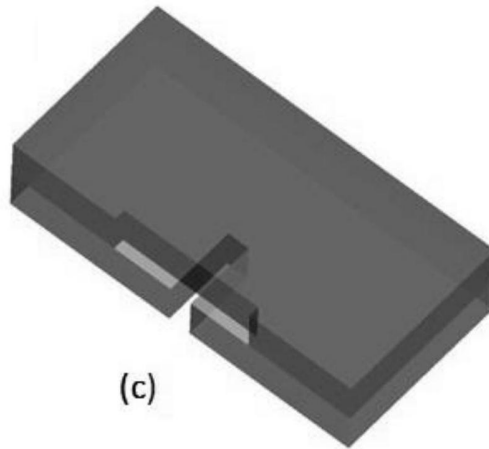




(a)



(b)



(c)

图2