

应用于单分子测序的纳米微结构器件^{*}

李运涛^{1,3,†} 任鲁凤^{2,3} 周晓光^{1,3} 于军^{2,3} 俞育德^{1,3}

(1 中国科学院半导体研究所 集成光电子学国家重点联合实验室 北京 100083)

(2 中国科学院北京基因组研究所 基因组科学与信息重点实验室 北京 100029)

(3 中国科学院半导体研究所 中国科学院北京基因组研究所 生物信息获取与传感技术联合实验室 北京 100083)

摘要 基因测序技术是现代最为重要的生物医学研究手段之一,单分子测序技术作为最新一代测序技术被广泛研究,并形成了微纳制造、光电子、微流控和分子生物学等多学科的交叉探索和多种技术创新的有机结合.文章系统总结了应用于单分子测序的纳米微结构器件的原理和功能,重点阐述了零模波导器件和纳米孔器件在单分子测序中的作用以及制备工艺,从器件的角度提出了单分子测序技术所面临的挑战.

关键词 单分子测序,纳米微结构器件

Nanostructure devices for single molecule sequencing

LI Yun-Tao^{1,3,†} REN Lu-Feng^{2,3} ZHOU Xiao-Guang^{1,3} YU Jun^{2,3} YU Yu-De^{1,3}

(1 State Key Laboratory of Integrated Optoelectronics, Institute of Semiconductors, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100083, China)

(2 Key Laboratory of Genome Sciences and Information, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China)

(3 The Joint Laboratory of Bioinformation Acquisition and Sensing Technology, Institute of Semiconductors, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100083, China)

Abstract As a most important biomedical technology, DNA sequencing, especially single molecule sequencing, has become a research focus not only in biology but also in engineering and physics. It combines nanofabrication, optoelectronics, microfluidics, and molecular biology technologies together to develop our capability to detect the activities of single nucleotides. In this review, the nanostructure devices for single molecule sequencing are summarized. The principle and structure of zero-mode waveguides and nanopore devices are described in detail, as well as the challenges of single-molecule sequencing.

Keywords single molecule sequencing, nanostructure devices

1 引言

DNA 测序技术自发明以来就一直在推动分子生物学发展方面起着至关重要的作用,已经成为分子生物学研究的基础手段之一.有人甚至将基因组测序技术的发展与半导体技术的发展相提并论,在过去的数十年中,测序速度一直以与半导体工业中摩尔定律(Moores law)相类似的形式呈指数增长.目前,基因测序已经不仅是科研手段的拓展,大规模的基因组测序也不仅只是政府和科研单位的行为,

基因已经成为一种资源,也是一种商品,在国民经济的各个部门(如食品、制药、个体化医疗、临床检验、生物医学、动植物学等方面)的应用日益广泛.

单纯从技术角度来分析,从早期 Frederick Sanger 的手工测序,以及基于 Sanger 法开发的第一代自动化测序仪,到目前的以合成法测序为代表的第二代测序平台,以及未来第三代、第四代单分子测序技术的

^{*} 国家自然科学基金青年基金(批准号:61007033)资助项目;中国科学院科研装备研制项目(批准号:YZ200823)

2011-09-02 收到

[†] 通讯联系人. Email: ytli@semi.ac.cn

前沿研究,基因测序技术从单纯依赖于化学和生物学,转向依靠与其他工程性学科,尤其是半导体微纳加工技术、微电子学、光电子学、纳米技术等相结合,来实现基因的检测(见表1),而且这种趋势在近两年关于单分子测序技术的研究中尤其明显^[1-5].

表1 DNA测序关键技术

DNA 测序关键技术	第1代	第2代	第3代	第4代
DNA 杂交		✓	✓	
DNA 酶法测序	✓	✓	✓	
聚合酶链式反应(PCR)	✓	✓		
电泳	✓			
微纳制造		✓	✓	✓
光电子学	✓	✓	✓	✓
微流控技术		✓	✓	✓
单分子检测			✓	✓

所谓单分子测序技术,是指在单个生物分子层面上观测单个核苷酸的物理、化学或者生物学特性,区别并标定不同的核苷酸在DNA链上的排列顺序,从而测定待测DNA链的序列.单分子技术可以避免现在测序技术中需要大规模扩增所导致的平均效应,能够低干扰地有效识别长读长核苷酸序列,降低序列拼接难度,提高准确率.同时,在一个限定的表面上,使用单个分子可以增加独立分析DNA片段的数量,因此,可以使数据产出量更高,这将进一步降低测序的成本.但单分子测序技术同时也带来了新的挑战,要从复杂的生物分子运动中区分出单分子荧光,不仅要求系统的分辨率高到可以区分单个分子,而且系统还必须具备能够有效降低非检测特异性的背景干扰(例如没有参与到实际化学反应中的游离荧光分子),将单分子荧光从背景噪声中区分出来的能力.表1中的技术分析表明,光电技术以及微流控技术、微电子技术在单分子测序技术中正在成为主流技术.而基于微纳制造技术的纳米微结构器件则成为单分子检测技术的核心和技术难点^[6-9].

2 应用于单分子测序的纳米微结构器件

2.1 零模波导器件(Zero-mode waveguide, ZMW)

所谓“零模波导”,是指当波导尺寸下降到小于 $\lambda/2$ 时,光波将不能在波导中传输,而是以倏逝波的形式按e指数规律衰减,这样,在波导的底部就形成了体积仅为仄升(zeptoliter, 10^{-21} 升)量级的薄层光场,比传统的共聚焦显微镜的观测体积还小3个数量级.利用零模波导进行单分子测序,可以保证只有

在薄层光场中的分子所携带的荧光基团才能被激发,形成了对光场的高度局域化,观测体积内的分子浓度可以达到微摩尔量级,可以充分保证酶反应的进行.利用零模波导的另一个优势是表面荧光增强效应.它是指分布于金和银等金属表面或其纳米粒子附近的荧光物质的荧光发射,较之自由态荧光发射强度大大增强的现象.将荧光物质置于粗糙金属表面,可以增加该荧光物质的荧光量子产率,降低其荧光寿命,提高荧光物质的光学稳定性;如果将荧光物质置于超薄金属表面,则可将各向同性的荧光发射转变为高度定向发射,从而大大提高荧光信号的采集效率.目前对表面荧光增强效应的具体原理还不是十分清楚,其中比较主流的观点认为,当光照射在这些亚波长小孔的表面发生衍射和散射时,将会在其上产生消逝场,这些消逝场一部分由于隧道效应穿透到小孔的另一面,在另一面,消逝场将会被散射,这样将会形成传播场,在这里,表面等离子体的近场增强特性对消逝场的衰减进行了补偿,有效地提高了能量的传输效率,即局域化的表面等离子体极化效应(SPP).Bloom等人在2006年的实验指出,A647染料在金和铝制成的150nm孔径的零模波导(ZMW)中,可以分别获得12倍和7倍的荧光增强,这种荧光增强可以极大地提高信噪比,对单分子探测意义重大^[10-16].

利用零模波导的上述优势,美国Pacific Bioscience公司开发了单分子实时测序仪Pacbio RS,其测序读长超过1000bp.

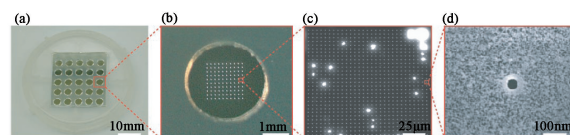


图1 Pacbio RS单分子实时测序系统所采用的零模波导阵列

图1为Pacbio RS单分子实时测序系统所采用的零模波导阵列结构示意图.图1(a)所示的零模波导阵列芯片中含有约80万个图1(d)所示的零模波导,利用微纳加工技术在各个反应区(见图1(c))之间集成百纳米量级的微流控通道,保证反应试剂能够依次进入所需观测的各个反应区.测序反应发生时,带有不同颜色荧光基团的核苷酸被置于零模消逝波波导底部的DNA聚合酶捕获,与模板上的单链DNA发生聚合反应,其所携带的荧光基团在波导底部厚度只有十几纳米范围内的激发光的作用下,释放出不同颜色的荧光分子.通过鉴别不同颜色的荧光,就可以知道发生反应的核苷酸,从而可以确

定 DNA 单链上对应的互补碱基,单分子测序反应就这样持续不断地被观测到^[17-21]。

可以采用现有的工艺制备技术制备零模波导芯片:在清洁的衬底表面旋涂光刻胶,经过电子束光刻及曝光后,在衬底上形成尺度与要制备的零模波导相当的胶柱,沉积铝以后再剥离,在胶柱的位置就形成了零模波导(见图 2)。还可以利用分辨率极高的光刻掩膜直接刻蚀,或者利用聚合物做掩膜等多种工艺方法来制备零模波导。目前遇到的主要问题是批量制备的成品率不高,零模波导阵列的均匀度也有待提高^[22]。利用零模波导进行单分子测序的另一个困难来自于对零模波导的生物修饰,即如何将 DNA 聚合酶固定于零模波导的底部。在目前的 Pacbio RS 测序仪中,只有约 30% 的零模波导被成功地进行生物修饰,从而可以用来进行单分子测序。如果能够提高修饰成功率,则测序通量就能得到极大提高。

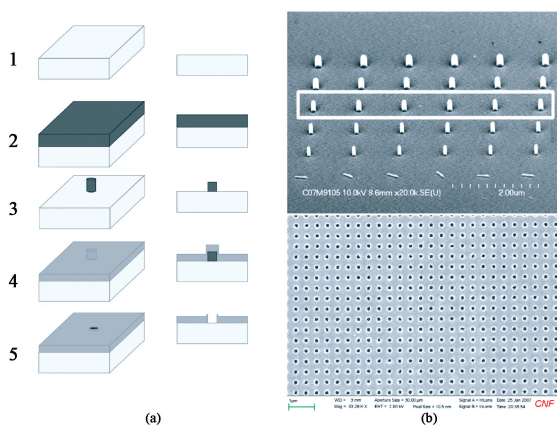


图 2 零模波导阵列制备工艺 (a) 工艺流程图; (b) 上图是制备的胶柱的 SEM 图, 下图是零模波导的 SEM 图

2.2 纳米孔器件

能够不借助于化学方法而直接对 DNA 序列进行读取是 DNA 测序技术领域一直追求的目标,而利用纳米孔实现单分子测序是目前公认实现直接测序的最可行路线之一。利用固态物质或者生物分子制备直径 1—2nm 的小孔,通过测量 DNA 分子通过纳米孔时不同的物理、化学特性来确定 DNA 碱基序列。对于单分子测序而言,对纳米孔器件的要求也十分简单。首先是尺度要足够小,保证在同一时间内只有一条 DNA 链能够通过;其次是不能对 DNA 或者核苷酸有破坏性,在液态条件下性能稳定。除此以外,最好能够进行酶修饰,或者是能够进行各种物理特性检测(如电流、电压)的材料。目前,各种材料的纳米孔不断被提出,并应用于单分子测序领域,如 α -溶血素蛋白、氮化硅、石墨烯、碳纳米管等。

英国 Oxford Nanopore 公司是纳米孔测序技术

领域的先行者之一,他们采用 α -溶血素蛋白(见图 3(a))这种天然的生物纳米孔作为测序载体。天然 α -溶血素蛋白的尺度在 1.5nm 左右,基于核酸分子带负电荷,可以通过偏置电场控制单链 DNA 通过 α -溶血素蛋白所形成的纳米孔。此时,通过纳米孔的离子电流受到核苷酸的阻碍而降低。由于组成 DNA 分子的核苷酸的尺寸和结构不同,对离子电流的阻塞程度也就有差异,因此,通过测量离子电流降低程度的差异就可以区分出不同的碱基^[23-25]。基于同样的原理,美国华盛顿大学和阿拉巴马大学的联合小组采用了耻垢分枝杆菌 porin A (mycobacterium smegmatis porin A)(见图 3(b)),克服了天然 α -溶血素蛋白结构缺陷所带来的离子电流差异低的缺点,降低了对检测电路的要求,使得测序精度更高,价格也更便宜^[26,27]。

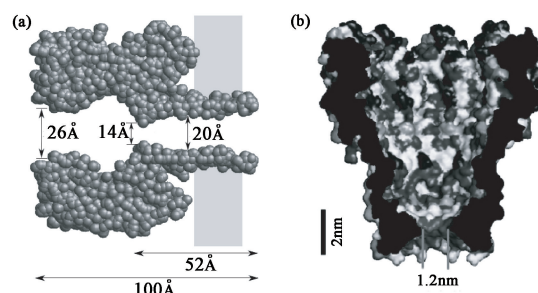


图 3 生物纳米孔 (a) α -溶血素蛋白; (b) 耻垢分枝杆菌 porin A

天然的纳米孔具有结构精确、重复性好等优势,但是其缺点也显而易见,难以大批量制备,难以与检测系统兼容制备,对环境要求高,尤其是其对温度和酸碱度的敏感,使得 DNA 链穿过纳米孔时的速度难以控制,这都是生物纳米孔成为单分子测序平台的最大障碍。

随着微纳加工技术的进步,利用微纳加工技术制备尺度在几个纳米量级的纳米孔来进行核苷酸检测开始被科学界所重视。所采用的材料主要集中于硅基材料,如二氧化硅、氮化硅、碳化硅以及碳纳米管和石墨烯等。

硅基材料的加工技术已经发展了近 50 年,微电子工艺的光刻精度已经向 32nm 迈进,因此,能够利用硅基材料制备纳米孔自然就成了人们的第一选择。实际上,在纳米孔技术应用于单分子测序被提出之前,制备硅基材料纳米孔的工作就已经开展了。目前制备硅基材料纳米孔的主要思路是,先用刻蚀等加工工艺制备尺度在 100nm 以内的微孔,然后以微孔为模板进行缩孔。缩孔工艺包括离子束缩孔、电子束缩孔、沉积法缩孔以及激光束缩孔等^[28-33]。直接

利用粒子束穿孔和刻蚀方法形成纳米孔的技术也被越来越多的人所重视。比较典型的是 J. Gierak 等人利用聚焦为 5nm 的 Ga⁺ 离子束流轰击 20nm 厚的 SiC 膜,可以得到尺寸小于 3nm 的纳米孔(见图 4)。

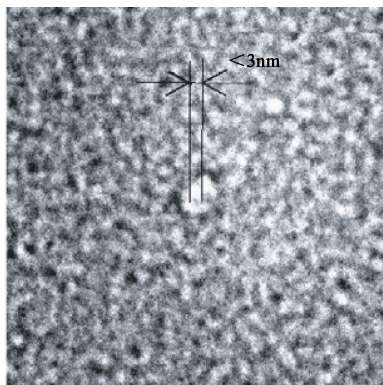


图 4 SiC 纳米孔

碳纳米管本身就是纳米孔,目前已经能够制备直径在 1nm 到 2nm 的单壁纳米通道. 在纳米管上施加偏置电流,由于电场的作用,单链 DNA 片段进入碳纳米管,并由正极向负极运动. 美国亚利桑那州立大学研究发现,在单链 DNA 易位(translocation)过程中,可以在碳纳米管内检测到强烈的电流尖峰,通过检测这种 DNA 易位过程中的电子信号特性,可以进行快速 DNA 测序(见图 5). 利用纳米孔技术进行快速测序的关键在于对 DNA 的易位进行精确控制,而碳纳米管则使这种控制变得简单^[34,35].

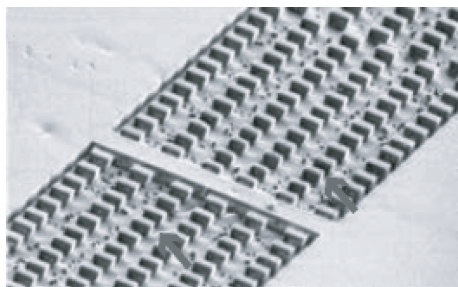


图 5 利用碳纳米管检测 DNA 序列

还可以利用碳纳米管内嵌入探针来检测每一碱基横向电流的方式进行单分子测序,通过在碳纳米管中横向装载一对电极束对通过碳纳米管的碱基施加横向电流,基于隧道效应,不同碱基的电子隧穿电流不同. 纳米管能以一种独特的方式和方向与碱基结合,从而确保在纳米孔中的每个核苷酸分子的朝向一致,同时,还可以通过调节温度、离子强度或偏置电压来控制 DNA 链通过纳米管的速度,从而确保隧穿电流的稳定,有效消除背景噪声和分子运动带来的干扰^[35,36]. 这种直读式的测序方式一旦成功,只需 100 个纳米孔,一天时间就能完成一个人类

基因组的测序,有望实现花 1000 美金测序一个人类基因组的目标。

石墨烯是近年被广泛研究的材料,被认为是最有潜力替代硅的材料之一. 美国宾西法尼亚大学的研究组将其成功地应用到单分子测序中. 利用氮化硅微米孔做掩膜,用扫描电子显微镜的电子束在石墨烯薄膜上灼烧出尺度只有几纳米的纳米孔(见图 6),由于单原子层石墨烯的厚度比 DNA 链上两相邻碱基之间的距离(0.4nm)还要小,因此相对于其他纳米孔,石墨烯纳米孔的检测精度更高. 同时,石墨烯还被认为制备未来高速晶体管的理想材料,有望实现单分子测序过程与检测系统的集成^[37,38].

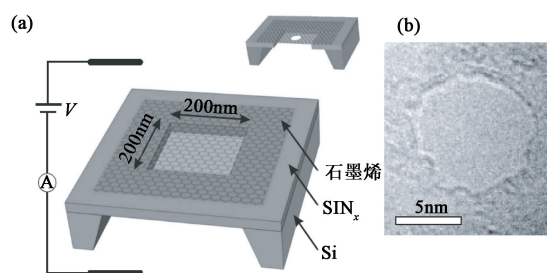


图 6 (a)利用石墨烯纳米孔实现单分子测序的原理图;(b)石墨烯纳米孔的扫描电镜图

利用纳米孔实现单分子测序技术是目前国际研究的热点,但也面临很多困难. 从纳米孔器件本身来看,最大的挑战还是来自于纳米孔器件的结构和构造,以及制备工艺的稳定性. 到目前为止,还没有一种生物纳米孔或人工纳米孔能够实现检测单个核苷酸造成的电流改变. 主要原因就在于目前有实验报道的这些纳米孔都太长,没有一个长度短于 5nm (石墨烯纳米孔可以短于 5nm,但是还没有实验报道),而 DNA 链上两相邻碱基之间的距离仅为 0.4nm,这就意味着在纳米孔通道内同时有 10—15 个碱基的单链 DNA 分子,所以无法对单个碱基分子进行检测. 即使是石墨烯纳米孔,由于电场区域向通道两侧扩展大约一个通道直径的长度,直径 1.5nm 的纳米孔内的电流分辨率最高只能达到 3nm,这就决定了只检测电流强度的变化无法达到检测单个碱基分子所需的分辨率要求^[39—41]. 利用纳米孔,结合其他生化反应,共同实现对单个核苷酸分子动态检测,也许会是实现纳米孔测序的可行途径,正如同 Oxford Nanopore 公司利用核酸外切酶将核苷酸切下,然后让其依次通过纳米孔进行测序一样,或者如同挪威 Lingvitae 公司结合纳米孔和分子信标进行测序一样。

生物纳米孔的稳定性和固态纳米孔的制造

问题是纳米孔器件面临的另一挑战。目前应用的生物纳米孔的寿命一般只有两周左右,很难被长期保存。同时,温度和溶液酸碱度是调控单链 DNA 通过纳米孔的关键因素之一,但是生物纳米孔在不同温度和高盐条件下,性能却很难保持均一稳定。对固态纳米孔器件来说,利用微纳加工技术获得直径在 1.5—2.0nm 的纳米孔芯片还是一件非常困难的工作,制作工艺繁琐,速度慢,而且制作出的产品还常常无法达到应用的要求,性能很难均一,尚无法生产出可以用于商业测序设备的纳米孔器件芯片。也许将生物纳米孔与固态纳米孔相结合,才是纳米孔器件制备的出路。

2.3 其他

除了零模波导及纳米孔器件以外,有越来越多的微纳器件被应用到单分子测序的行列中,如 Visigen 采用的荧光共振能量转移(FRET)技术中采用了量子点器件^[42],Cracker 提出利用在光电探测器芯片上制备纳米反应池(nanowell)来实现对测序反应的电检测^[43],Reveo 公司利用纳米通道结合刀锋纳米探针器件实现快速读出核苷酸序列的隧穿电流等^[44]。

3 结束语

单分子测序是一门正在快速发展的科学,各种测序方法都有其独到之处,也有更多的新方法不断被提出。但是,无论是哪一种方式,都以纳米微结构器件作为反应载体或者是检测手段。微纳加工技术与生物技术的完美结合,不仅仅体现在单分子测序领域,也贯穿于生物技术领域的各个层面,并将不断扩展、深入,推动生物技术的发展。

参考文献

- [1] Hausteil E, Schwille P. *Annu. Rev. Biophys. Biomo. Struct.*, 2007, 36: 151
- [2] Korlach J, Marks P J, Cicero R L *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105: 1176
- [3] Lasserre R, Guo X J, Conchonaud F *et al.* *Nat. Chem. Biol.*, 2008, 4: 538
- [4] Lenne P F, Wawrezinieck L, Conchonaud F *et al.* *EMBO J.*, 2006, 25: 3245
- [5] Leutenegger M, Gösch M, Perentes A *et al.* *Opt. Express*, 2006, 14: 956
- [6] Levene M J, Korlach J, Turner S W *et al.* *Science*, 2003, 299: 682
- [7] Lundquist P M, Zhong C F, Zhao P *et al.* *Opt. Lett.*, 2008, 33: 1026
- [8] Mahdavi F, Liu Y, Blair S. *Plasmonics*, 2007, 2: 129; Manion J T, Craighead H G. *Biopolymers*, 2007, 85: 131
- [9] Marguet D, Lenne P F, Rigneault H. *EMBO J.*, 2006, 25: 3446
- [10] Moran-Mirabal J M, Torres A J, Samiee K T *et al.* *Nano-technology*, 2007, 18: 195101; Novotny L, Hecht B. *Principles of nano-optics*. Cambridge University Press, 2006
- [11] Popov E, Nevière M, Wenger J *et al.* *J. Opt. Soc. Am. A*, 2006, 23: 2342
- [12] Rigneault H, Capoulade J, Dintinger J *et al.* *Phys. Rev. Lett.*, 2005, 95: 117401
- [13] Rust M J, Bates M, Zhuang X. *Nat. Methods*, 2006, 3: 793
- [14] Samiee K T, Foquet M, Guo L *et al.* *Biophys. J.*, 2005, 88: 2145
- [15] Samiee K T, Moran-Mirabal J M, Cheung Y K *et al.* *Biophys. J.*, 2006, 90: 3288
- [16] Shuford K L, Ratner M A, Gray S K *et al.* *J. Comput. Theor. Nanosci.*, 2007, 4: 239; Simons K, Ikonen E. *Nature*, 1997, 387: 569
- [17] Tanaka K, Tanaka M, Sugiyama T. *Opt. Express*, 2006, 14: 832
- [18] 徐秋燕. 首都师范大学学报(自然科学版), 2009, 30: 16 [Xu Q Y. *Journal of Capital Normal University (Nature Science Edition)*, 2009, 30: 16 (in Chinese)]
- [19] Zheng X L, Lombardi J R. *Proc. SPIE*, 2008, 70321x
- [20] 饶轶, 黄翊东. 清华大学硕士论文. 2004
- [21] 白永强, 刘丹, 朱星. *物理*, 2004, 33(12): 899 [Bai Y Q, Liu D, Zhu X. *Wuli(Physics)*, 2004, 33(12): 899 (in Chinese)]
- [22] Foquet M, Samiee K T, Kong Xiangxu *et al.* *Journal of Applied Physics*, 2008, 103: 034301
- [23] Zwolak M, Ventra M D. *Reviews of Modern Physics*, 2008, 80: 141
- [24] Meller A, Nivon L, Branton D. *Physical Review Letters*, 2001, 86: 3435
- [25] Clarke J, Wu H C, Jayasinghe L *et al.* *Nature Nanotechnology* Published online: 22 February 2009 DOI: 10. 1038/NNANO. 2009. 12
- [26] Butlera T Z, Pavlenok M, Derrington I M *et al.* *PNAS*, 2008, 105: 20647
- [27] Derrington I M, Butler T Z, Collins M D *et al.* *Nanopore DNA sequencing with MspA*. www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1001831107/-/DCSupplemental
- [28] Cai Qun, Ledden B, Krueger E *et al.* *Journal of Applied Physics*, 2006, 100: 024914
- [29] Storm A J, Chen J H, Ling X S *et al.* *Nature Materials*, 2003, 2: 537
- [30] Kim M J, Wanunu M, Bell D C *et al.* *Adv. Mater.* 2006, 18: 3149
- [31] Chen P, Mitsui T, Farmer D B *et al.* *Nano Letters*, 2004, 4: 1333
- [32] Kim M J, McNally B, Murata K *et al.* *Nanotechnology*, 2007, 18: 205302
- [33] Gierak J, Madouri A, Biance A L *et al.* *Microelectronic Engineering*, 2007, 84: 779
- [34] Liu Haitao *et al.* *Science*, 2009, 327: 64
- [35] Drmanac R, Sparks A B, Callow M J *et al.* *Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-Assembling DNA Nanoarrays*. www.sciencemag.org/cgi/content/full/1181498/DC1
- [36] Rief M *et al.* *Nature Structural Biology*, 1999, 6(4): 346
- [37] Postma Henk W Ch. *Nano Lett.*, 2010, 10: 420
- [38] Garaj S, Hubbard W, Reina A *et al.* *Nature*, 2010, 467: 190
- [39] Branton D, Deamer D W, Marziali A *et al.* *Nature Biotechnol.*, 2008, 26(10): 1146
- [40] Metzker M L. *Nature Reviews/Genetics*, 2010, 11: 31
- [41] Pennisi E. *Science*, 2010, 327: 1190
- [42] Hardin S, Gao Xianlian, Briggs J *et al.* *Methods for real-time single molecule sequence determination*. US Patent: 7329492
- [43] <http://www.crackerbio.com/index.htm>
- [44] <http://genomics.xprize.org/teams/reveo-inc>