文章编号：1007－4627(2006)01－0035－05

荷能重离子径迹刻蚀纳米通道技术及其应用*

张伟明，王宇钢#，薛建明
（北京大学重离子物理研究所，北京 100871）

摘　要：纳米通道技术是 20 世纪末发展起来的一种可以直接解读核酸分子编码信息的新方法，基本原理是借助膜片钳装置将不同核苷酸通过纳米通道的电信号直接翻译为相应的核苷酸信息。它较现有的方法简便、快捷和经济，并有可能推广应用到分子筛、单核苷酸多态分析以及对生物离子通道模拟上，其中以荷能重离子径迹刻蚀纳米通道最具应用潜力。详细介绍了荷能重离子径迹刻蚀纳米通道的制备、研究进展及其在生命科学上的应用前景。

关 键 词：纳米通道；离子径迹刻蚀；核酸测序；生物传感器
中图分类号：TL99；O644.23；Q615　　**文献标识码**：A

1 引言

纳米通道技术最初是作为一种可以直接解读核酸分子编码信息的新方法，诞生于 20 世纪 90 年代中期，被认为是非常有希望成为下一代生物大分子测序的新方法。它较现有的测序方法简单、快捷和经济，具有重大的应用前景。随着人们对这项技术的深入研究以及科学发展的需求，它的应用前景扩展到了生物分子检测、分子筛、单核苷酸多态分析和生物膜离子通道模拟等热点领域，成为当前生物信息学、纳米科学和制药学等相关学科中非常活跃的前沿领域。近两年来，不仅有一批高水平工作陆续在 Nature，Science，PRL，JACS 和 Nano Letter 等刊物上发表，而且已经开始有国际知名制药公司也进入这一领域的研究。可以预见，这一研究领域的进展将对人类生活产生重大影响。

在目前应用的各类方法中，荷能重离子径迹刻蚀方法制备纳米通道具有制作过程简单、结构稳定和可重复制作等特点，最有潜力使得这项技术转化为实际应用。

2 纳米通道技术的提出

先前由 Fredrick Sanger 提出的测序方法——凝胶电泳[1]，是通过在复制 DNA 的过程中加入 ddA/ddT/ddC/ddG 来终止反应，从而得到不同长度的 DNA 片段，然后用凝胶电泳实验测出 DNA 序列。Fredrick Sanger 由于他的这一重大研究成果于 1980 年成为继鲍林、居里夫人、巴丁后世界上第四位两次获得诺贝尔奖的科学家。但是大的片段（>500 个核苷酸）不能一次测出，因为它在凝胶中的迁移率和它的长度不再成线性关系。因此，人类基因组计划经过了 10 年的时间，花费了 3 亿美元才得以完成[2]。事实上，人们迫切希望 DNA 测序可以作为一种真正高效、低成本的方法在临床诊治、生物多样性分析和生物进化等领域得到普遍的应用。纳米通道技术及其在生命科学上的应用就是在这种背景下产生的。

纳米通道技术在生命科学上的应用，最初是在 1996 年由美国国家科学技术研究所的 Kasianowicz 和哈佛大学的 Brandin 等人共同提出的[3]。基本原理是用膜片钳微电流测量装置测量单链 DNA 或 RNA 通过纳米通道（α 溶血素（α-HL）通道）时的电流变化，从而对其序列及其浓度进行探测和描述。目前在这一领域活跃的研究单位主要有美国的加州大学、哈佛大学、佛罗里达州立大学，以及德国的重离子物理研究所。

由于最初使用的天然 α 溶血素（α-HL）通道具有通道尺寸不可调、重复性差、操作难度大等缺点，

收稿日期：2005－07－14；**修改日期**：2005－12－27
作者简介：张伟明（1982－），女（汉族），山西大同人，博士研究生，从事离子束应用的研究；E-mail：wmzhang@pku.edu.cn
联系人：王宇钢，E-mail：ygwang@pku.edu.cn

目前人们已经用多种方法和材料制作出了不同尺寸、形状，以及性能的人工纳米通道，以使纳米通道技术的应用范围扩大并尽早得以应用。例如，刻蚀法(反应离子刻蚀[4]、等离子体刻蚀[5]和离子径迹刻蚀[6—9]等)、热模压印法[10]、离子束加工法[11]、TEM 加工法[12]和模板合成法[13]。

在众多方法中，荷能重离子径迹刻蚀法制备纳米通道是最有希望使这一纳米通道技术得以应用的方法。相对于其它制备方法，它不仅成本低、制作过程简单、重复性好、具有优异的物理和化学稳定性、可形成多通道膜，而且通过改变辐照离子的能量、膜材料的性质和刻蚀条件，可以得到不同形状和不同大小(孔径、深度)的纳米通道，从而能够使不同直径的物质通过。最诱人的是可利用不同纳米通道膜材料的性质，对其进行后期的修饰。这些特性不仅为核酸分子的测序提供了可能，而且很大程度上会促进纳米通道技术在生命科学中其他领域的应用，如分子筛、生物膜离子通道模拟。德国重离子物理研究所和美国佛罗里达州立大学在此领域做了大量深入的研究工作。目前，荷能重离子径迹刻蚀法制备纳米通道已经成为当前国际上纳米通道技术研究的热点。

3 荷能重离子径迹刻蚀纳米通道的制备方法

离子径迹刻蚀是指用刻蚀剂对被荷能重离子辐照过的膜进行刻蚀，由于径迹区的刻蚀速率大于非径迹区的刻蚀速率($v_{track} > v_{bulk}$)，从而可形成孔洞[7—9]。实验装置及原理如图 1 所示。实验中，将被离子辐照过的高分子膜放在两个电解室间，一边放有刻蚀剂，另一边对应的放有抑制剂，用来减缓通透后的进一步刻蚀，并在两边加上一定浓度的缓冲液。刻蚀过程中给电解池两端加上一定的电压，并用 pA 电流计对刻蚀过程中的电流进行监测。当

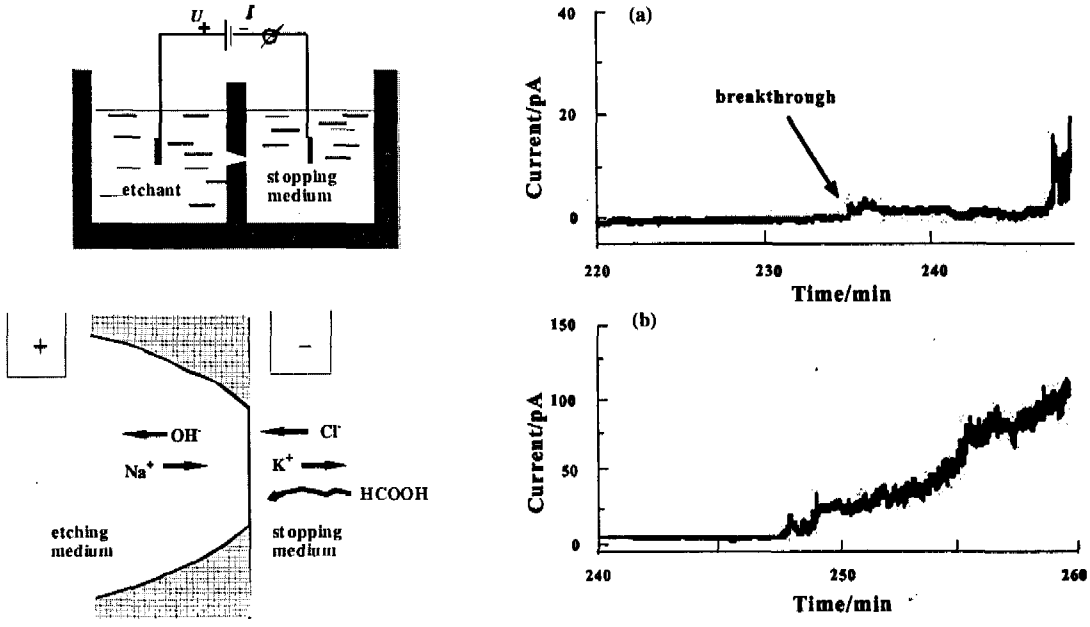

图 1 离子径迹刻蚀法实验装置及原理示意图

左边为实验装置示意图；右边为用 NaOCl 刻蚀 Kapton 膜上单个离子径迹的电流-时间曲线，其中，(a) 为刻蚀过程的最后 30 min，(b) 为孔径增大过程中的电流变化[7—9]。

电流显示为零时，表明膜尚未通透；当电流突然增加时，表明膜已被刻透。紧接着用缓冲液冲洗放有刻蚀剂的电解室，从而减缓或终止进一步的刻蚀。可见，通过控制电流持续时间的长短，可以得到不同孔径的纳米通道。

4 荷能重离子径迹刻蚀纳米通道技术的研究进展

4.1 基本性质研究

对纳米通道的研究首先是从它的形成条件和基

本性质开始的。对于能量限制[14]的研究发现，要想刻蚀出均一性好的孔，需使 $dE/dx \geqslant 450$ eV/Å。在 180 eV/Å$\leqslant dE/dx \leqslant$450 eV/Å 的范围内，虽然可以刻蚀出通道，但是孔径分布的离散性很大；在 $dE/dx \leqslant 180$ eV/Å 的范围内则不可以形成通道(如图 2 所示)。

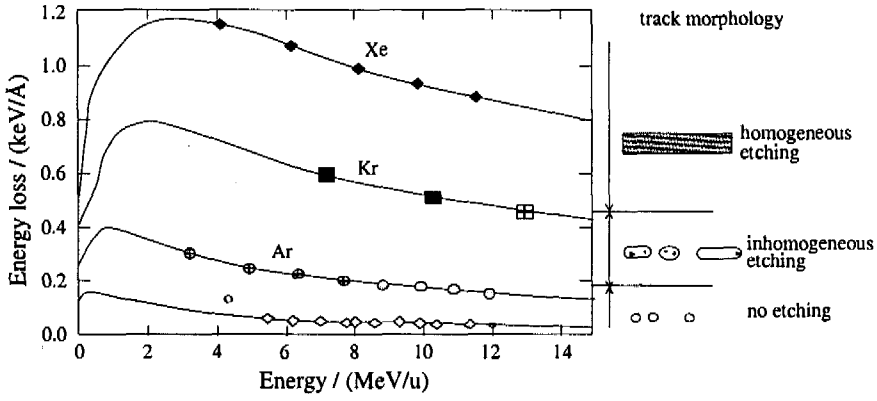

图 2　计算得到的重离子在 Kapton 膜中的能损曲线及相应的孔径分布[14]

北京大学重离子物理研究所的王宇钢教授所带领的研究组也开展了这方面的研究工作，图 3 给出了该研究组制备出的 Kapton 纳米通道的 SEM 图像，以及此类纳米通道的 *I-U* 曲线。

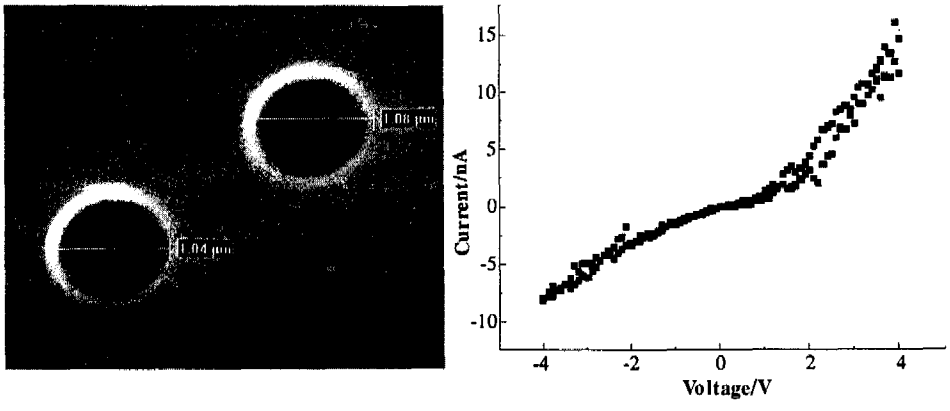

图 3　Kapton 纳米通道的 SEM 图像(Pb 离子，15 MeV/u)(左)和此类纳米通道的 *I-U* 曲线(右)

对 pH 值和刻蚀时间对形成的纳米通道的尺寸(孔径 d)和形状(半张角 β)的影响研究发现[15]，在 7≤pH 值≤12.3 范围内孔径与刻蚀时间呈线性关系，时间越长，孔径越大；并且刻蚀时间一定，pH 值越大，孔径越大。半张角 $\beta = \arcsin(v_b/v_t)$ 和溶液 pH 值大致呈指数关系，v_b 和 v_t 分别为离子未注入区和注入区的刻蚀速率，pH 值越大，半张角越大，亦即锥形孔的锥角越大(如图 4 所示)。从文献[15]可见，通过调节刻蚀时间和溶液的 pH 值可以调整纳米通道的孔径和半张角。

从离子径迹刻蚀纳米通道的 *I-U* 曲线看出，锥形的 PET 和 Kapton 纳米通道[7]都和天然的生物膜 K 离子通道[16]相似，具有类似于二极管的整流特性(见图 3(右)和图 5)。当 pH 值为 7 时整流作用最明显，当 pH 值为 3，2 时整流作用消失(见图 5)。另外，还发现整流特性，$I(-U)/I(U)$，不仅与所加电压的绝对值基本呈线性关系，还和电解质溶液(KCl)浓度有关，浓度变高时其整流特性变得不明显。这是由于高的 K^+ 浓度使得通道壁上的Debye屏蔽层变薄，增大了有效孔径，从而减弱了整流作用[7]。

4.2　核酸分子检测

关于 α 溶血素通道在单个单链 DNA 和 RNA 分子检测方面应用的可能性，人们已经进行了较多的研究，但是由于 α 溶血素本身性质的限制，结果

并不理想。为此人们进行了其它纳米通道在检测单分子方面的研究。结果较好的是 Mara 和 Siwy 等[6]对荷能重离子刻蚀纳米通道在检测单个 DNA 分子方面所进行的研究。

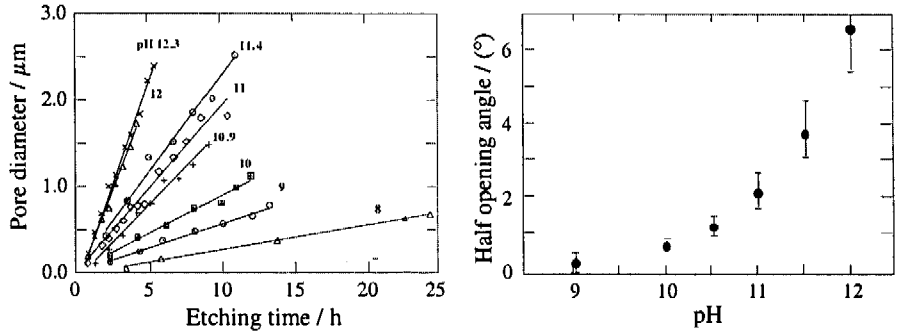

图 4 不同 pH 值(7—12.3)下纳米通道的孔径-刻蚀时间曲线（左）和纳米通道半张角-溶液 pH 值曲线（右）[15]

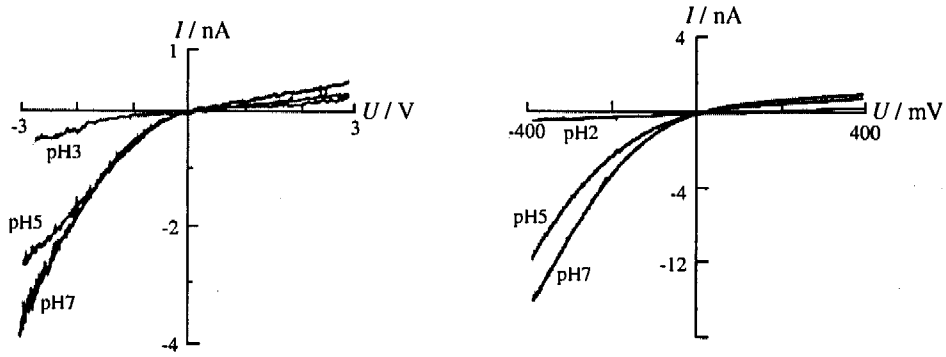

图 5 PET(左)和 Kapton(右)膜中纳米通道的 *I-U* 曲线[7]

文献[6]中用到的是一个非对称的锥形 Kapton 纳米通道，深度约为 10 μm，小端孔径约为 4 nm，具有大的纵宽比，又由于 Kapton 纳米通道与其它纳米通道相比具有稳定的电信号，因此为区分不同长度的 DNA 分子提供了可能。他们分别进行了两组实验，一组为具有粘端的 284 bp 和 4.1 kb 的 DNA 片段，另一组为具有平端的 286，974 和 4 126 bp 的 DNA 片段。实验结果[6]表明，Kapton 纳米通道可以依据阻塞时间与 DNA 分子长度成正比的规律对不同长度的 DNA 分子进行区分。

4.3 蛋白质分子生物传感器

Siwy 等[17]还利用荷能重离子径迹刻蚀纳米通道制作成了蛋白质分子生物传感器。在含有一个锥形(～30/600 nm)荷能重离子径迹刻蚀纳米通道的 PET 膜的外表面和通道内表面同时用非电化学的方法[13]镀上一层很薄的金膜，然后对通道的窄口进行功能化，使其对某种蛋白质分子具有特异识别功能，只能和这种蛋白质分子结合。由于功能化后的通道窄口的直径和与其特异结合的蛋白质分子的直径相当，则仅当这种被分析蛋白质分子与通道窄口结合时，通道电流才减为零。

这种蛋白质分子生物传感器的研究将生物分子探测中电流变化的幅度和持续时间的长短简化到了电流的有无。不仅扩大了荷能重离子径迹刻蚀纳米通道的应用范围，更大大地加快了荷能重离子径迹刻蚀纳米通道的应用步伐。

5 纳米通道技术在生命科学上的应用前景

纳米通道在超高速核酸分子测序、单核苷酸多态分析、分子筛和生物膜离子通道模拟等领域均有重要的应用。利用纳米通道技术可每秒超过1 000 碱基的速度进行核酸序列分析，一个科学家使用该系统的测序速度可达到现所有研究人员测序速度的总和，可见能够大幅度提高测序效率和降低成本。

单核苷酸多态分析(SNPs)是一项非常诱人的分析方法，它不仅在研究个体间的形态差异、遗传规律方面有重要意义，而且由于很多 SNPs 具有临床意义，使得它在病理诊断、法医破案方面有很重

要的用途。纳米通道技术正在加速这种分析方法的应用。

目前分离生物大分子的方法还是靠传统的沉淀、电泳，精度不高。利用纳米通道孔径小而且可变的特点则可很容易地把不同大小的生物大分子进行分离。

荷能重离子径迹刻蚀纳米通道具有单向导通性，类似于生物膜离子通道。因此可以作为模拟生物膜离子通道某些性质的材料，加深对生物膜两侧物质传输规律的进一步认识。

总之，荷能重离子径迹刻蚀纳米通道技术是一项涉及到核技术、分子生物学、生物化学和电子学等多门学科的技术，具有非常广泛的应用前景，将会给人们将来的生活带来革命性的变化。

参 考 文 献：

[1] Sanger F, Nicklon S, Coulson A R. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, **74**: 5 463.

[2] NIH/NHGRI 2000 International Human Genome Sequencing Consortium Announces Working Draft of Human. Genome Press release http://www. nih. gov/news/pr/jun2000/nhgri-26. htm.

[3] Kasianowicz J J, Brandin E, Branton D, *et al*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93**: 13 770.

[4] Heng J B, Ho C, Kim T, *et al*. Biophys J, 2004, **87**: 2 905.

[5] Li N C, Yu S F, Harrell C C, *et al*. Anal Chem, 2004, **76**: 2 025.

[6] Mara A, Siwy Z, Trautmann C, *et al*. Nano Lett, 2004, **4** (3): 497.

[7] Siwy Z, Apel P, Baur D, *et al*. Surf Sci, 2003, **532—535**: 1 061.

[8] Apel P Yu, Korchev Yu E, Siwy Z, *et al*. Nucl Instr and Meth, 2001, **B184**: 337.

[9] Siwy Z, Dobrev D, Neumann R, *et al*. Appl Phys, 2003, **A76**: 781.

[10] Tiefenauer L, Ketterer B, Haas B, *et al*. PSI Annual Report 2001.

[11] Li J L, Stein D, McMullan C, *et al*. Nature, 2001, **412**: 166.

[12] Storm A J, Chen J H, Ling X S, *et al*. Nat Mater, 2003, **2**: 537.

[13] Hulteen J C, Martin C R. J Mater Chem, 1997, **7**(7): 1 075.

[14] Trautmann C, Bouffard S, Spohr R. Nucl Instr and Meth, 1996, **B116**: 429.

[15] Trautmann C, Bruchle W, Spohr R, *et al*. Nucl Instr and Meth, 1996, **B111**: 70.

[16] Jiang Y X, Lee A, Chen J Y, *et al*. Nature, 2002, **417**: 515.

[17] Siwy Z, Trofin L, Kohli P, *et al*. J Am Chem Soc, 2005, **127**: 5 000.

Etched Energetic Heavy Ion Track Nanochannel Technology and Its Application

ZHANG Wei-ming, WANG Yu-gang, XUE Jian-ming

(*Institute of Heavy Ion Physics, Peking University, Beijing* 100871, *China*)

Abstract: Nanochannel technology is a new method of sequencing nucleic acid directly, originated at the end of the last century. The essestial principle is to translate the current signal into the nucleic acid sequence information by a patch clamp equipment as it passes through the nanochannel. This method is cheaper, simpler and faster than any other existing method. Futhermore, it can be applied in molecular griddle, SNPs, biological membrane ion channel simulation, and other important biochemical areas. Up to now, etched energetic heavy ion track nanochannel is the most potential nanochannel to accelerate its application. This paper deals chiefly with its preparation, research progress and application prospect in biology.

Key words: nanochannel; etched ion track; nucleic acid sequencing; biological sensor