

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 256**

51 Int. Cl.:

H01J 47/00 (2006.01)

H01J 49/02 (2006.01)

G01N 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2010 PCT/US2010/039451**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2010 WO10151527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2010 E 10792564 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2446511**

54 Título: **Detección masiva de moléculas mediante emisión en campo de electrones desde membranas**

30 Prioridad:

22.06.2009 US 489037

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.02.2018

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
614 Walnut Street
Madison, WI 53726, US**

72 Inventor/es:

**ROBERT, H., BLICK;
SMITH, LLOYD;
WESTPHALL, MICHAEL y
QIN, HUA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 653 256 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección masiva de moléculas mediante emisión en campo de electrones desde membranas

- 5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos otorgado por las siguientes agencias: USAF/AFOSR FA9550-08-1-0337. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 10 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de los Estados Unidos 12/489.037, presentada el 22 de junio de 2009; la cual se incorpora aquí como referencia en la medida no inconsistente con la presente divulgación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Durante las últimas décadas, la espectrometría de masas se ha convertido en una de las herramientas analíticas más ampliamente aplicables para la detección y caracterización de amplias clases de moléculas. El análisis de espectrometría de masas es aplicable a casi cualquier especie química capaz de formar un ion en la fase gaseosa, y por lo tanto, proporciona quizás el método de análisis cuantitativo más universalmente aplicable. Se ha puesto una mayor cantidad de enfoque en el desarrollo de métodos de espectrometría de masas para analizar mezclas complejas de biomoléculas, tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos y complejos de los mismos. En particular, el análisis de la secuencia de proteínas ha sido impulsado por los avances en el campo de la espectrometría de masas (Domon et al., Review - Mass spectrometry and protein analysis. Science, 2006. 312(5771): 212-217; Ashcroft, A.E., Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. Natural Product Reports, 2003. 20(2):202-215; Mann et al., Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. Annual Review of Biochemistry, 2001. 70:437-473; and Coon et al., Tandem mass spectrometry for peptide and protein sequence analysis. Biotechniques, 2005. 38(4): 519, 521, 523).

- Actualmente, el análisis de proteínas se puede realizar mediante una variedad de técnicas de electroforesis o mediante espectroscopía de masas. El análisis de espectroscopía de masas es intrínsecamente más rápido y más preciso para la determinación del peso molecular. En contraste con la movilidad electroforética, que es una propiedad extrínseca y altamente dependiente de la condición de las moléculas, la relación masa a carga (m/z) utilizada en la espectroscopía de masas es una propiedad intrínseca e independiente de la condición de los iones. Esto significa que una relación m/z determinada en un espectrómetro de masas es un parámetro intrínsecamente más preciso y confiable, utilizado para el análisis de una molécula, que la movilidad electroforética. En segundo lugar, la velocidad de los análisis de espectroscopía de masas es realmente fenomenal, con el potencial de milisegundos por análisis. Eso significa que, si los métodos de espectroscopía de masas para proteómica se pueden desarrollar en una forma adecuada robusta y de alto rendimiento, tienen el potencial de transformar radicalmente la naturaleza de los esfuerzos de secuenciación a gran escala.

- 40 Un obstáculo fundamental en la espectroscopía de masas ha sido el rango de masa limitado accesible para el análisis de ácidos nucleicos y proteínas usando desorción y ionización de matriz asistida por láser (MALDI) o ionización por electroaspersión (ESI). Esta limitación se manifiesta como una caída dramática en la intensidad de la señal al aumentar la masa. Este fenómeno ha limitado el análisis de las mezclas de secuenciación a masas de fragmentos de menos de 100 kDa, siendo más típico 50 kDa. Se ha demostrado que la disminución de la intensidad de señal para mezclas de proteínas grandes se debe únicamente a los efectos relacionados con el instrumento, y no a problemas químicos tales como la eficacia de la ionización o la fragmentación de la solución o de la fase gaseosa. Un análisis cuantitativo exhaustivo de los problemas instrumentales muestra que, con mucho, el problema más importante de la instrumentación es la detección de iones. Una combinación de la bien conocida disminución en el rendimiento de electrones secundarios a partir de microcanales o detectores de multiplicadores de electrones con aumento de la masa de iones, así como los bien conocidos efectos de la saturación del detector en el análisis de mezcla, se combinan para dar la caída dramática de señal observada en el análisis de masa de estas mezclas complejas de especies de alto peso molecular.

- Actualmente, entre los detectores más sensibles se encuentran los calorímetros criogénicos, fabricados a partir de uniones superconductoras que funcionan a temperaturas ultrabajas tales como menos de 100 mK (Patente de los Estados Unidos 5.994.694 y Twerenbold et al., Detection of Single Macromolecules Using a Cryogenic Particle Detector Coupled To A Biopolymer Mass Spectrometer. Applied Physics Letters. 68 (1996) 3503). La unión superconductora es comúnmente polarizada por voltaje en su borde de transición de pendiente de la característica IV, mientras que el cristal se mantiene a una temperatura muy por debajo de la temperatura de transición superconductora T_c . Las proteínas aceleradas inducen lluvias de fonones térmicos que calientan todo el cristal. Este aumento de temperatura se controla en el cambio de la característica IV, ya que la transición de fase superconductora depende fuertemente de la temperatura. La cantidad de calor depositada por los fonones es directamente proporcional a la energía de las partículas incidentes. Por lo tanto, estos detectores superconductores poseen una resolución extremadamente alta y son capaces de resolver incluso proteínas muy pesadas (varios MDa). Sin embargo, los principales inconvenientes de esta clase de detectores son las temperaturas de funcionamiento muy por debajo de 1K y el número limitado de píxeles de detección (máximo 16). Estas limitaciones

también incluyen un tiempo de recuperación lento y el hecho de que los elementos detectores individuales son poco susceptibles de arrastre debido a la complejidad, es decir, el número de cables a cada píxel y la necesidad de disipar el calor depositado en el bolómetro por los iones moleculares. Sin embargo, incluso con el progreso actual, es dudoso que tales detectores alguna vez estén operativos a la temperatura ambiente o cerca de ella, ya que requieren elementos superconductores. La necesidad de refrigeración criogénica aumenta el gasto y la dificultad de un experimento y no es probable que se adopte fácilmente.

Lo que se necesita son detectores capaces de detectar moléculas, que (1) sean tan sensibles como sea posible con eficiencia de detección de unidades ('resolución de protones individuales'), (2) no presenten una pérdida de sensibilidad para moléculas grandes, y (3) no requieran temperaturas criogénicas para el funcionamiento. Como la resolución continúa siendo de suma importancia, también es importante que los detectores sean rápidos, de modo que el proceso no tenga una resolución limitada por el detector.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un detector activo y métodos para detectar moléculas que incluyen proteínas y oligonucleótidos basados en la generación de electrones a través de emisión de campo (FE) y/o emisión de electrones secundaria (SEE) a través de fonones. El detector comprende una membrana semiconductor que tiene una superficie externa que está en contacto con una o más moléculas, y una superficie interna que tiene una capa delgada que emite electrones. La energía cinética de las moléculas que entran en contacto con la membrana semiconductor se transfiere a través de la membrana mediante la generación de cuantos vibratorios (es decir, fonones) que viajan desde la superficie externa de la membrana a la capa emisora de electrones en la superficie interna e induce la emisión de electrones la capa emisora. Un detector de electrones, que puede o no incluir un medio para la amplificación de electrones, está posicionado para detectar los electrones emitidos.

Opcionalmente, el detector es parte de un espectrómetro de masas o de un analizador de movilidad diferencial. Por ejemplo, en una realización, el detector se monta en un sistema MALDI/TOF para espectroscopía de masas convencional y utiliza una placa multicanal (MCP) para la amplificación de la señal. Las moléculas se desorben e ionizan según el método MALDI y se aceleran en una línea de haz (configuración TOF), que posteriormente golpean la superficie externa de la membrana. La energía cinética de la molécula se transfiere a la membrana semiconductor e induce la emisión de electrones desde la capa emisora delgada. Los electrones emitidos se detectan o amplifican utilizando un MCP que proporciona una señal para el análisis de masa/carga eléctrica y la posterior identificación de la muestra.

En una realización, el detector de moléculas comprende una membrana semiconductor que tiene una superficie externa para recibir moléculas y una superficie interna situada opuesta a la superficie externa, en la que la membrana semiconductor tiene un espesor de 5 nanómetros a 50 micrómetros. Preferiblemente, la membrana semiconductor tiene un espesor de 10 nanómetros a 50 micras, 10 nanómetros a 1 micra, 10 nanómetros a 500 nanómetros, o más preferiblemente 50 nanómetros a 300 nanómetros. En una realización, la membrana semiconductor tiene un espesor mayor que 5 nanómetros, preferiblemente mayor que 10 nanómetros. En otra realización, la membrana semiconductor tiene un espesor menor que 50 micrómetros, preferiblemente menor que 500 nanómetros.

Se proporciona una capa emisora de electrones en la superficie interna de la membrana semiconductor, en la que la capa emisora tiene un espesor de 5 nanómetros a 10 micras, y en el que la capa emisora emite electrones cuando la membrana semiconductor recibe las moléculas. Preferiblemente, la capa que emite electrones tiene un espesor de 5 nanómetros a 1 micra, 5 nanómetros a 100 nanómetros, 10 nanómetros a 25 nanómetros, o más preferiblemente 10 nanómetros a 20 nanómetros. En una realización, la capa que emite electrones tiene un espesor mayor que 5 nanómetros, preferiblemente mayor que 10 nanómetros. En otra realización, la capa que emite electrones tiene un espesor menor que 10 micrómetros, preferiblemente menor que 100 nanómetros. El detector de moléculas también comprende un detector de electrones posicionado para detectar al menos una porción de los electrones emitidos por la capa emisora.

La capa de emisión de electrones puede comprender cualquier material capaz de emitir electrones a través de emisión de campo (FE) y/o emisión de electrones secundaria (SEE). En una realización, la capa que emite electrones comprende un material seleccionado del grupo que consiste en metales, semiconductores altamente dopados y materiales de diamante dopados. Los materiales de diamante altamente dopados se pueden hacer de materiales de diamante sobre aislante (DOI) como se conoce en la técnica. Si la capa que emite electrones es una capa metálica delgada, es preferible usar un metal que no se oxide, como el oro. La capa emisora recubre al menos una parte de la superficie interna de dicha membrana semiconductor, preferiblemente entre 50% y 100% de la superficie interna de la membrana semiconductor, incluso más preferiblemente entre 75% y 100% de la superficie interna de la membrana semiconductor.

Opcionalmente, la capa de emisión de electrones está polarizada eléctricamente para generar emisión de campo, emisión de electrones secundaria o ambas. Preferiblemente, la capa emisora es polarizada eléctricamente aplicando

un voltaje de -3000 V a 3000 V a la capa emisora. En una realización, la capa emisora es polarizada eléctricamente aplicando una tensión entre -1000 V y 1000 V. La superficie externa de la membrana semiconductor también está opcionalmente polarizada eléctricamente aplicando un voltaje de -2000 V a 2000 V. En una realización, la superficie externa está polarizada eléctricamente aplicando un voltaje de -1000 V a 1000 V. Alternativamente, la membrana semiconductor se proporciona sustancialmente en la base. El detector también puede comprender un electrodo posicionado entre la membrana semiconductor y el detector de electrones. El electrodo está polarizado eléctricamente para generar emisión de campo, emisión secundaria, o ambos, desde la capa emisora de electrones o para generar emisión profunda desde la propia membrana semiconductor. En una realización, el electrodo es un electrodo de cuadrícula que es al menos parcialmente transmisivo a los electrones incidentes de la capa de emisión de electrones. Por ejemplo, el electrodo de cuadrícula puede transmitir al menos el 50% de los electrones incidentes, preferiblemente al menos el 75% de los electrones incidentes. Preferiblemente, el electrodo está polarizado eléctricamente aplicando un voltaje de -2000 V a 2000 V. En una realización, el electrodo está polarizado eléctricamente aplicando un voltaje de -1000 V a 1000 V.

La membrana semiconductor comprende una o más capas de un material semiconductor capaz de transmitir fonones balísticos y fonones ópticos y acústicos no balísticos con polarizaciones transversal o longitudinal, o ambas, que se generan cuando la superficie externa de la membrana es impactada por una molécula. Preferiblemente, la membrana semiconductor puede lograr una alta eficiencia de conversión de la energía cinética de las moléculas que entran en contacto con la membrana semiconductor a los fonones y la eficacia de transmisión de los fonones a la capa emisora de electrones. La eficiencia de conversión y la eficiencia de transmisión se pueden mejorar aumentando la dureza y/o la temperatura de Debye (Θ_D) del material semiconductor. Los materiales semiconductores adecuados para usar en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, silicio (Si), germanio, (Ge) y nitruro de silicio (SiN), semiconductores de diamante sobre aislante y combinaciones de los mismos. En una realización, la membrana semiconductor comprende una pluralidad de capas de uno o más materiales semiconductores, en donde cada una de las capas tiene un espesor de 1 nanómetro a 1000 nanómetros. Preferiblemente, cada capa tiene un espesor de 5 nanómetros a 100 nanómetros. Adicionalmente, la membrana semiconductor puede comprender una secuencia alterna de capas que comprende el mismo o diferentes materiales semiconductores, en donde la secuencia comprende dos o más capas. En una realización, cada capa de la membrana semiconductor comprende un único material cristalino. Opcionalmente, la membrana semiconductor comprende además una capa protectora proporcionada en la superficie externa. La capa protectora es preferiblemente una capa metálica delgada que tiene un espesor de 5 nanómetros a 25 nanómetros, más preferiblemente un espesor de 10 nanómetros a 20 nanómetros, que previene los efectos de carga de materiales semiconductores de baja conductividad, tales como SiN.

En una realización, la capa emisora y la superficie interna de la membrana semiconductor son sustancialmente planas sin salientes, tales como características de relieve que tienen dimensiones longitudinales de 100 nanómetros o mayores. Sin embargo, el uso de técnicas de bombardeo iónico para agregar una capa emisora, tal como una capa de metal, a la membrana semiconductor dará lugar a pequeños picos o áreas de rugosidad superficial que se formarán en la capa emisora en comparación con una superficie muy lisa. Estos picos y la rugosidad de la superficie pueden reducir el umbral de voltaje debido al factor de reducción geométrica y pueden mejorar la probabilidad de emisión. En una realización, la capa emisora tiene un espesor uniforme que no varía en más del 20% en un área activa, preferiblemente en no más del 10%, incluso más preferiblemente en no más del 5%. En una realización adicional, el espesor combinado de la membrana semiconductor y la capa emisora tiene un espesor uniforme que no varía en más del 20% en un área activa, preferiblemente en no más del 10%, incluso más preferiblemente en no más del 5%.

La patente de los Estados Unidos 7,408,147 describe dispositivos y métodos para detectar moléculas en sistemas MALDI, ESI y TOF que utilizan nanopilares que tienen longitudes entre aproximadamente 100 nanómetros y 3 micrómetros unidos a la superficie interna de una membrana impactada por las moléculas. Aunque la presente invención puede acomodar el uso de nanopilares, la presente invención no requiere nanopilares para la generación o propagación exitosa de fonones o la emisión de electrones. En ciertas realizaciones de la presente invención, el detector no contiene nanopilares ni estructuras similares unidas a la membrana semiconductor. Se entiende que los nanopilares deben excluirse de estas realizaciones.

H. Qin y col., Appl. Phys. Let. 91, 183506 (2007) describen un dispositivo multiplicador de electrones que comprende una membrana de silicio tapada con capas de óxido de silicio y nitruro de silicio. Las capas de tapado están parcialmente grabadas para exponer la membrana de silicio.

La generación y propagación de fonones es más eficiente a temperaturas extremadamente bajas. Las bajas temperaturas, como por debajo de 100 Kelvin, reducen la cantidad de ruido de fondo eléctrico y reducen la cantidad de energía perdida debido a la conversión a energía térmica, aunque debe tenerse en cuenta que la aplicación de grandes voltajes para la extracción de electrones y emisión de electrones puede provocar calentamiento de la membrana semiconductor. Sin embargo, mantener estas bajas temperaturas es costoso y requiere un gran esfuerzo. Aunque el detector de la presente invención sería funcional a temperaturas criogénicas, la membrana semiconductor es capaz de convertir la energía del fonón en FE y/o SEE a temperatura ambiente y por encima de la temperatura ambiente. En una realización, la temperatura operativa más baja es mayor que 10 mK, mientras que

la temperatura operativa superior depende de la temperatura de desintegración del material semiconductor (aproximadamente 1700 K para Si). Preferiblemente, el detector se proporciona a una temperatura entre 10 mK y 1500 K, más preferiblemente entre 2 K y 600 K, más preferiblemente entre 100 K y 500 K, incluso más preferiblemente entre 250 K y 400 K.

5 El detector de electrones puede ser cualquier dispositivo conocido en la técnica capaz de recibir y detectar electrones emitidos desde la capa emisora. El detector de electrones puede comprender opcionalmente medios para amplificar electrones emitidos desde la capa emisora, que incluyen pero no se limitan a un osciloscopio. En una realización, el detector de electrones comprende una o más placas de microcanal (MCP) o dínodos posicionados en el camino de los electrones emitidos por la capa emisora. En otra realización, el detector de electrones comprende además una pantalla fotoluminiscente y un fotodetector, en el que la pantalla fotoluminiscente recibe electrones emitidos por la capa emisora y genera radiación electromagnética que es detectada por el fotodetector. Preferiblemente, el detector de electrones está situado a 50 nanómetros y 10 centímetros de la capa emisora de electrones. En una realización, el detector de electrones está situado a 100 nanómetros y a 8 centímetros de la capa emisora de electrones. Alternativamente, el MCP y la membrana se combinan, lo que reduce la deriva de fondo y el ruido, al tiempo que aumenta el rango de masa detectable. Esto se basa en el mecanismo de transducción de energía de la membrana, ya que convierte la mayor parte de la energía cinética primero en vibraciones reticulares dentro de la membrana y luego en electrones emitidos. Los electrones emitidos son luego multiplicados por el MCP.

20 Opcionalmente, los detectores de la presente invención comprenden un sustrato que tiene una o más áreas detectoras activas capaces de recibir una molécula, donde cada área activa del detector comprende una membrana semiconductor y una capa emisora. La membrana semiconductor para cada área activa se puede seleccionar o manipular para que sea sensible a una masa molecular específica. Las áreas activas del detector pueden hacerse sensibles a la misma masa molecular o diferentes masas moleculares en comparación entre sí. Preferiblemente, cada área activa tiene un área de superficie entre 0.1 milímetros² a 20² centímetros². Alternativamente, cada área activa puede tener un área superficial menor a 0.1 milímetros², pero forma un área total mayor que varias pulgadas cuadradas.

30 Otra realización de la presente invención proporciona un método para detectar una molécula proporcionando un detector que comprende: a) una membrana semiconductor que tiene una superficie externa para recibir moléculas, y una superficie interna situada opuesta a la superficie externa, donde la membrana semiconductor tiene un espesor de 5 nanómetros a 50 micras, preferiblemente un espesor de 10 nanómetros a 500 nanómetros, y b) una capa emisora de electrones que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en metales, semiconductores dopados y materiales dorados de diamante provistos en la superficie interna de la membrana semiconductor, en la que la capa emisora tiene un espesor de 5 nanómetros a 10 micras, preferiblemente un espesor de 5 nanómetros a 100 nanómetros y en el que la capa emisora emite electrones cuando la membrana semiconductor recibe moléculas. El método comprende además poner en contacto moléculas con la superficie externa de la membrana, generando de ese modo electrones emitidos por la capa emisora; y detectar los electrones emitidos por la capa emisora. En una realización adicional, la detección de los electrones emitidos comprende posicionar un detector de electrones en la trayectoria de al menos una parte de los electrones emitidos y opcionalmente amplificar los electrones emitidos usando un MCP o un dínodo. Opcionalmente, la capa emisora, la capa semiconductor o ambas están polarizadas eléctricamente. La capa de emisión está polarizada eléctricamente para establecer un potencial eléctrico a través de la capa de emisión de -3,000 V a 3.000 V, preferiblemente un potencial eléctrico de -1,000 V a 1,000V.

45 Otra realización proporciona un método para detectar moléculas que comprende los pasos de:

a) proporcionar un detector que tiene áreas de detección activas, en el que cada área de detección activa comprende: una membrana semiconductor que tiene una superficie externa para recibir moléculas, y una superficie interna opuesta a la superficie externa, donde dicha membrana semiconductor tiene un espesor de 10 nanómetros a 50 micras, preferiblemente un espesor de 10 nanómetros a 500 nanómetros; una capa emisora de electrones que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en metales, semiconductores dopados y materiales de diamante dopado provistos en la superficie interna de la membrana semiconductor, en donde la capa emisora tiene un espesor de 5 nanómetros a 10 micras, preferiblemente un espesor de 5 nanómetros a 100 nanómetros, y en el que la capa emisora emite electrones cuando la membrana semiconductor recibe moléculas;

b) poner en contacto moléculas con la superficie externa de dicha membrana semiconductor;

60 c) convertir la energía cinética de las moléculas que entran en contacto con la superficie externa en vibraciones reticulares de la membrana semiconductor para generar fonones;

d) transferir los fonones a la capa emisora, generando de este modo electrones de la capa emisora en respuesta a la transferencia de fonones; y

65 e) detectar electrones emitidos por la capa emisora.

Las moléculas susceptibles de ser detectadas usando el detector y los métodos de la presente invención incluyen moléculas grandes (al menos 50 kDa, al menos 100 kDa o incluso al menos 1.000 kDa) tales como proteínas y oligonucleótidos. Debido a que el detector utiliza la energía cinética de la molécula en contacto con la membrana semiconductor para generar fonones, la presente invención es capaz de detectar moléculas neutras, que no están cargadas o son difíciles de ionizar con técnicas MALDI tradicionales, permitiendo así una amplia gama de esquemas de detección altamente sensibles de moléculas para proteómica. La manipulación térmica y/o eléctrica de las moléculas y la membrana puede usarse para mejorar aún más la detección de moléculas neutras. El detector es compatible con la tecnología existente al tiempo que permite la detección de moléculas neutras y proteínas grandes, lo que no se puede hacer de manera efectiva con la tecnología existente.

En una realización, los detectores de la presente invención también pueden tener funcionalidad de detección de energía. Por ejemplo, los detectores de la presente invención pueden usarse para medir la energía cinética de una molécula que impacta en la superficie externa del detector. La energía y el número de fonones generados por el impacto de la molécula son directamente proporcionales a la energía cinética de la molécula. En consecuencia, el número de electrones emitidos desde la membrana también es proporcional a esta energía. Una integración sobre el área del pico luego entrega esta energía cinética total de las partículas entrantes.

El detector de la presente invención proporciona una plataforma de detección versátil para una gama de analizadores de masas, que incluyen, pero no se limitan a, analizadores de masas cuadrupolares, analizadores de masas de sectores magnéticos, analizadores de masas de tiempo de vuelo y analizadores de masas de trampa de iones.

En una realización, las moléculas detectadas por el detector de la presente invención son iones que impactan en la superficie externa de la membrana con una energía cinética de 10 keV a 50 keV. La energía cinética de los iones se convierte al menos parcialmente en vibraciones reticulares de la membrana semiconductor. En una realización adicional, el detector comprende un analizador de tiempo de vuelo en comunicación fluida con la superficie externa de la membrana semiconductor. Los iones separados por el analizador de tiempo de vuelo impactan la superficie externa de la membrana semiconductor, permitiendo que los datos de tiempo de vuelo sean recolectados con la detección de las moléculas. En otra realización, el detector comprende un acelerador de iones en comunicación fluida con la superficie externa de la membrana semiconductor, donde los iones son acelerados por el acelerador de iones e impactan la superficie externa de la membrana semiconductor.

Una realización adicional de la presente invención comprende medios para liberar moléculas que han entrado en contacto con la superficie externa de la membrana semiconductor. Los medios para liberar moléculas de la superficie externa incluyen, pero no se limitan a, generar un pulso de energía térmica, un pulso de radiación electromagnética, un pulso de corriente eléctrica o una onda de choque en la superficie externa de la membrana semiconductor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un espectro de masas representativo de una mezcla equimolar de patrones de oligonucleótidos usando instrumentos estándar. El espectro ilustra la caída de la señal asociada con el aumento de la masa de las moléculas detectadas.

La Figura 2 ilustra un detector de la presente invención. Una membrana semiconductor con una capa emisora se coloca de modo que las moléculas de un tubo de vuelo entren en contacto con la superficie externa de la membrana semiconductor. Los electrones emitidos desde la capa emisora se transmiten a través de un electrodo de cuadrícula a un detector de electrones, que incluye un MCP.

La Figura 3 ilustra un detector similar de la presente invención con un electrodo de cuadrícula metálica colocado entre la membrana semiconductor y el detector de electrones. También se ilustra la trayectoria de los electrones emitidos desde la capa metálica emisora.

La Figura 4 ilustra el circuito de un detector de electrones que comprende un MCP utilizado para amplificar los electrones, un ánodo utilizado para recoger los electrones y generar un voltaje, y un osciloscopio utilizado para medir el voltaje.

La Figura 5 muestra una membrana semiconductor de la presente invención sobre un sustrato. Cada una de las ventanas es un área activa del detector, mientras que las capas con dibujos de plata sostienen mecánicamente las membranas.

La Figura 6 muestra un sistema de tiempo de vuelo/MALDI que incorpora un detector de la presente invención.

La Figura 7 muestra un espectro de masas de angiotensina (1.289 Da) obtenido usando un detector de la presente invención.

Las Figuras 8 y 9 muestran los espectros de masas de insulina bovina obtenidos usando detectores de la presente invención.

5 La Figura 10 muestra un espectro de masa del citocromo C (12.362 Da) obtenido usando un detector de la presente invención.

La Figura 11 muestra un espectro del tiempo de vuelo de la insulina obtenida usando un detector de la presente invención.

10 La Figura 12 muestra una comparación de un MCP convencional y el detector de Membrana-MCP combinado de la presente invención.

15 La figura 13 muestra una comparación de las amplitudes de oscilación y la frecuencia de una membrana detectora de la presente invención después de ser impactada por albúmina de suero bovino con carga simple (BSA 1+) y albúmina de suero bovino doblemente cargada (BSA 2+).

La Figura 14 muestra una comparación del tiempo de relajación de la oscilación entre BSA 1+ y BSA 2+.

20 La figura 15 muestra una comparación de las amplitudes de oscilación y la frecuencia de una membrana detectora de la presente invención para diferentes masas (picos en un espectro).

La Figura 16 muestra el tiempo de relajación de una variedad de picos en un espectro usando un detector de la presente invención.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

30 "Molécula" se refiere a una colección de átomos unidos químicamente con una composición característica. Como se usa en el presente documento, una molécula se refiere a moléculas neutras o moléculas cargadas eléctricamente (es decir, iones). Las moléculas pueden referirse a moléculas cargadas individualmente y moléculas cargadas de forma múltiple. El término molécula incluye biomoléculas, que son moléculas que son producidas por un organismo o son importantes para un organismo vivo, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, lípidos, moléculas de ADN, moléculas de ARN, oligonucleótidos, carbohidratos, polisacáridos; glicoproteínas, lipoproteínas, azúcares y derivados, variantes y complejos de estos.

40 "Ion" se refiere en general a átomos, moléculas y macromoléculas multiplicadas o cargadas individualmente que tienen carga eléctrica positiva o negativa y a complejos, agregados y agrupaciones de átomos, moléculas y macromoléculas que tienen carga eléctrica positiva o negativa. Ion incluye cationes y aniones.

45 "Membrana" se refiere a un componente de dispositivo, tal como un elemento estructural delgado, predominantemente plano. Las membranas de la presente invención incluyen membranas semiconductoras capaces de emitir electrones cuando las moléculas entran en contacto con el lado receptor de la membrana. Las membranas útiles en la presente invención pueden comprender una amplia gama de materiales adicionales que incluyen materiales dieléctricos, materiales cerámicos, materiales poliméricos, vidrios y metales.

50 La "emisión de campo" (FE) o "emisión de campo electrónico" (FEE) es la descarga de electrones desde la superficie de un material condensado (como un metal o semiconductor) sometido a un fuerte campo eléctrico al vacío o a otro material.

"Emisión secundaria" o la "emisión secundaria de electrones" (SEE) es un fenómeno en el que partículas incidentes primarias de energía suficiente, cuando golpean una superficie o atraviesan algún material, inducen la emisión de partículas secundarias, tales como electrones.

55 "Área activa" se refiere a un área de un detector de la presente invención que es capaz de recibir moléculas y convertir la energía cinética de las moléculas que impactan en la superficie para generar fonones.

"Fonón" se refiere a una unidad de energía vibratoria que surge de átomos oscilantes dentro de una red cristalina.

60 "Semiconductor" se refiere a cualquier material que es un material que es un aislante a una temperatura muy baja, pero que tiene una conductividad eléctrica apreciable a una temperatura de aproximadamente 300 Kelvin. En la presente descripción, el uso del término semiconductor está destinado a ser coherente con el uso de este término en la técnica de la microelectrónica y los dispositivos eléctricos. Los semiconductores útiles en la presente invención pueden comprender semiconductores de elementos, tales como silicio, germanio y diamante dopado, y semiconductores compuestos, tales como semiconductores compuestos del grupo IV tales como SiC y SiGe, semiconductores del grupo III-V tales como AlSb, AlAs, Aln, AlP, , BN, GaSb, GaAs, GaN, GaP, InSb, InAs, InN e

- InP, aleaciones de semiconductores ternarios del grupo III-V, como AlxGa1-xAs, semiconductores del grupo II-VI, como CsSe, CdS, CdTe, ZnO, ZnSe, ZnS y ZnTe, semiconductores del grupo I-VII CuCl, semiconductores del grupo IV-VI como PbS, PbTe y SnS, semiconductores de capa como Pbl₂, MoS₂ y GaSe, semiconductores de óxido como CuO y Cu₂O. El término semiconductor incluye semiconductores intrínsecos y semiconductores extrínsecos que están dopados con uno o más materiales seleccionados, incluyendo semiconductores que tienen materiales dopantes de tipo p y materiales dopantes de tipo n, para proporcionar propiedades eléctricas beneficiosas útiles para una aplicación o dispositivo dado. El término semiconductor incluye materiales compuestos que comprenden una mezcla de semiconductores y/o dopantes.
- En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos de los dispositivos, componentes del dispositivo y métodos de la presente invención a fin de proporcionar una explicación completa de la naturaleza precisa de la invención. Sin embargo, será evidente para los expertos en la técnica que la invención se puede poner en práctica sin estos detalles específicos.
- La Figura 1 muestra un espectro de masas representativo obtenido de dispositivos convencionales que usan una mezcla equimolar de patrones de oligonucleótidos. El espectro ilustra una caída de la señal a medida que las moléculas aumentan en masa. Los dispositivos convencionales están limitados a oligonucleótidos que tienen menos de 100 nucleótidos, siendo 50 nucleótidos el límite más típico. Este resultado es similar con otras moléculas a medida que aumenta la masa. La presente invención utiliza la energía cinética de las moléculas a medida que impactan en la superficie del detector, lo que permite la detección de moléculas grandes y pequeñas. Los detectores de la presente invención se han usado para analizar una amplia gama de proteínas/péptidos, incluyendo péptidos grandes tales como insulina bovina (aproximadamente 5.733 Da), angiotensina (aproximadamente 1.296 Da) y citocromo C (aproximadamente 12.362 Da) como se muestra en las Figuras 7 -10.
- El diseño básico y el principio de funcionamiento de los detectores 1 de la presente invención se indican en las figuras 2 y 3. Una membrana 2 semiconductor delgada (preferiblemente de 10 nanómetros a 300 nanómetros de espesor) se mecaniza a partir de una estructura de semiconductor. La superficie 4 externa de la membrana 2 está posicionada para recibir moléculas de una fuente 16 de molécula, tal como un acelerador de iones o un tubo de fuga. La superficie 7 interna de la membrana 2 semiconductor comprende una capa 3 emisora de electrones a partir de la cual se emiten electrones 8 (ilustrados en la Figura 3) cuando una molécula impacta la superficie 4 externa de la membrana 2. Una capa 10 protectora delgada, típicamente una capa metálica delgada, puede cubrir la superficie 4 externa (como se muestra en la Figura 3). Por ejemplo, la membrana semiconductor puede comprender una capa de 100 nanómetros de SiNx que tiene una capa protectora de oro de 30 nanómetros posicionada sobre la superficie externa y una capa de oro de 15 nanómetros sobre la superficie interna, donde la capa de 15 nanómetros sirve como capa emisora de electrones. La emisión de electrones proviene de la capa de 30 nanómetros como se muestra en la Figura 3, es decir, desde la superficie externa de acuerdo con la notación. La membrana 2 semiconductor está soportada por un soporte detector superior 17 y un soporte detector de fondo 18 y puede utilizar un espaciador 19 inerte, tal como teflón, para colocar el electrodo 9 muy cerca de la capa 3 emisora.
- La emisión de electrones 8 desde la capa 3 emisora es proporcional a la intensidad del impacto, es decir, el momentum transferido y, por lo tanto, la energía de la molécula. Los electrones 8 emitidos son a su vez acelerados por el electrodo 9 de activación y recogidos por el detector 5 de electrones. El detector 5 de electrones incluye opcionalmente una placa 11 multicanal estándar (MCP) y un ánodo 14 que detecta los electrones 8. Los electrones 8 entran en contacto con la capa 12 de entrada MCP causando la emisión de electrones adicionales por la capa 13 de salida MCP que amplifica los electrones 8.
- El ánodo 14 puede ser parte de un osciloscopio 15 u otro dispositivo capaz de detectar y mostrar la presencia de electrones, tal como se muestra en la figura 4. Las moléculas aceleradas y cargadas colisionan con la membrana 2 semiconductor y su impulso induce emisión de electrones a través de túneles asistidos por fonones desde la capa 3 emisora. En este punto, debe destacarse que el detector es capaz de resolver la masa de una molécula (m) mediante detección directa de fonones, pero también puede muestrear el estado de carga o la valencia de la molécula ionizada (z).
- Una molécula, tal como una proteína, impacta sobre la superficie 4 externa de la membrana 2 semiconductor y excita fonones balísticos y no balísticos. Una vez que la molécula alcanza la membrana 2, una parte de la energía que la molécula adquirió se disipará en cambios formacionales dentro de la molécula, mientras que aproximadamente la mitad de ella excitará fonones en la membrana. Si la molécula está cargada, también se podría esperar que esta detección sea detectada por el detector 1. Un detector 1, como se muestra en la figura 5, también puede comprender un sustrato 20 que tiene múltiples áreas 21 activas, donde cada área 21 activa tiene una membrana 2 semiconductor y capa 3 emisora.
- Preferiblemente, el detector 1 está integrado en un sistema de espectroscopía de masas, tal como se muestra en la Figura 6. Hay dos métodos principales que permiten introducir moléculas grandes en el vacío de un espectrómetro de masas, ionización por electroaspersión (ESI) y desorción/ionización de matriz asistida por láser (MALDI). La ventaja de MALDI ha sido el hecho de que produce iones moleculares predominantemente cargados del analito, y por lo tanto es relativamente adecuado para el análisis de mezcla (un pico por componente, produciendo espectros

de masas simples y fácilmente interpretables). ESI, aunque un proceso de producción de iones más suave con mayor precisión de masa que MALDI, tiene la propiedad de producir distribuciones complejas de iones en diversos estados de carga, y por lo tanto no ha demostrado ser adecuado para el análisis de mezclas que contienen muchos componentes (muchos picos por componente, causando "congestión espectral").

La separación de tiempo de vuelo (TOF) es una técnica bien establecida para la selección de masas y puede usarse para la separación de las proteínas. Las proteínas cargadas se aceleran en un voltaje eléctrico de CC de $V = 20 - 30$ kV a una energía de $E_{el} = qV = zeV$ y se canalizan a través de una abertura en la cámara TOF (e es la carga elemental). Dentro de la cámara, la separación de masa ocurre de acuerdo con la energía cinética $E_{el} = E_{kin} = mv^2/2$, que conduce a un tiempo de vuelo dependiente de la masa de $t = d/v = d (m/2qV)^{1/2} = d/(2eV)^{1/2} (m/z)^{1/2} = k (m/z)^{1/2}$, con d como la distancia recorrida y $k = d/(2eV)^{1/2}$, como factor de escala. Este enfoque conduce a una separación, donde las partículas más pequeñas pasan primero, mientras que las moléculas más grandes son las más lentas. Dependiendo de la tensión de aceleración y la longitud de la cámara TOF, la resolución puede mejorarse. Para la espectroscopía de masas de proteínas grandes, una longitud de la cámara TOF de aproximadamente $d = 1 - 2$ m es suficiente. La masa de la molécula se puede obtener midiendo t . En espectrometría de masas, la resolución se define como $m/\Delta m$. De la ecuación anterior, se puede demostrar que:

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$$

Esta ecuación simple demuestra que cuanto mayor es la homogeneidad en los tiempos de llegada de un ion particular y cuanto más precisamente se puede hacer la medición de tiempo, mayor es la capacidad de resolver su masa de otros iones. La cantidad a medir es, por lo tanto, la carga de una molécula particular, que llega después del tiempo t . Los tiempos típicos con los que se tiene que trabajar son del orden de varios 1 a 100 microsegundos.

El detector de electrones puede ser cualquier dispositivo conocido en la técnica y opcionalmente amplifica los electrones emitidos por la membrana semiconductor, tal como a través del uso de placas de microcanal (MCP). Las placas de microcanal se componen de una matriz paralela de multiplicadores de electrones de canal en miniatura. Típicamente, los diámetros de los canales están en el rango de 10 a 100 micras con las longitudes de los canales en la vecindad de 1 mm. Cada canal funciona como una estructura continua de dínodo, lo que significa que actúa como su propia cadena de resistencia de dínodo. Se coloca un potencial de 1 a 2 kV en cada canal. Cuando una molécula energética ingresa al extremo de potencial bajo del canal y golpea la pared del canal, produce electrones secundarios, que a su vez se aceleran a lo largo del tubo por el campo eléctrico. Estos electrones golpean la pared y generan más electrones. El proceso se repite muchas veces hasta que los electrones secundarios emergen del extremo de alto potencial del canal. En términos generales, para cada molécula que inicia una cascada, 10^4 electrones emergen del canal, proporcionando una ganancia significativa y, por lo tanto, la capacidad de hacer posible la detección de una sola molécula.

Tanto los detectores de dínodo discretos como los continuos se basan en la emisión secundaria de electrones (SEE) para su funcionamiento. La emisión secundaria ocurre cuando una superficie, bajo vacío, es bombardeada por moléculas o electrones con energías que varían de 10 a unos 1000 electronvoltios. Para la mayoría de los materiales, el número de electrones secundarios producidos por cada electrón primario se encuentra entre 0.2 y 3. Este número, que corresponde al número promedio de electrones creados, se conoce como el coeficiente de emisión secundaria. Los detectores de dínodo discretos típicos emplean hasta 16 etapas (dínodos). La ganancia total de este sistema puede alcanzar 10^8 . Los potenciales se establecen en cada dínodo mediante un divisor de potencial resistivo, o alternativamente cada dínodo puede conectarse a su propio circuito externo para proporcionar una rápida reposición de electrones cuando se utiliza con altas tasas de repetición. El detector de dínodo continuo, por otro lado, se basa en un material altamente resistente de modo que el potencial se puede colocar en todo el dispositivo.

Para una clase de molécula dada, un MCP puede ser muy sensible, con capacidades de detección de moléculas individuales. Se puede hacer grande en el área, ideal para el análisis de paquetes de iones como se describe anteriormente. Por último, exhiben tiempos de subida muy rápidos, del orden de varios nanosegundos.

Ejemplos

Se usaron membranas semiconductoras de Si y SiN y que tienen una capa delgada de oro que funciona como la capa de emisión para formar detectores activos para proteínas y otras moléculas grandes. Los detectores se montaron en un sistema MALDI/TOF para espectroscopía de masas convencional e incorporaron un MCP (placa multicanal). Las moléculas se desorben e ionizan (método MALDI) y se aceleran en una línea de haz (configuración TOF) y se ponen en contacto con la superficie externa de la membrana. La energía cinética $E_{kin} = \frac{1}{2} mv^2$ de la molécula se transfiere a la membrana a través de la generación de cuantos vibratorios (fonones), que viajan de atrás hacia adelante. En el lado frontal, la energía de vibración se transfiere de nuevo, pero ahora para soportar la emisión

de electrones de la delgada capa emisora en la parte superior. El metal en sí está polarizado por voltaje justo por debajo del voltaje de inicio de la emisión de campo convencional. Los experimentos descritos a continuación que muestran la detección de iones se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique específicamente lo contrario.

5

Ejemplo 1

Las mediciones del detector de la presente invención en comparación con detectores MCP estándar se resumen en la Figura 12. Se muestran dos trazas de datos, una del detector MCP convencional (etiquetado como MCP) y otra que usa el detector de membrana de la presente invención con un MCP (etiquetado como Detector + MCP). Como se ve, ambos detectores encuentran la misma estructura de pico con el pico más prominente alrededor de la marca de 23 microsegundos. Este es el pico que proviene de la molécula (angiotensina) utilizada como muestra de prueba en este caso particular. Esta molécula se carga y acelera negativamente en la unidad MALDI-TOF y luego viaja durante 23 microsegundos antes de que impacte en el detector. Los picos más pequeños que aparecen a escalas temporales más cortas son las moléculas utilizadas en la llamada matriz, es decir, la solución en la que se preparó la angiotensina.

En una inspección más cercana se encuentran varios hechos notables además de la prueba de concepto del detector de membrana en sí mismo. En primer lugar, la deriva de fondo del sistema detector de membrana semiconductor-MCP es mucho más baja que la deriva MCP convencional. En segundo lugar, el ruido en el sistema detector de membrana-MCP es menor que el detector MCP convencional y puede mejorarse aún más (optimización de la condición de polarización y ajuste de emisión de campo). Por último, y lo que es más importante, el rango de masas del sistema detector de membrana-MCP no está limitado como el detector MCP. Esto se debe al mecanismo de transducción de energía de la membrana semiconductor. Principalmente convierte la mayor parte de la energía cinética primero en vibraciones reticulares dentro de la membrana y luego en electrones 'pateadores' sobre la barrera de emisión del campo. Los electrones emitidos se multiplican luego por el MCP en sándwich con la membrana. Como nota final, debe señalarse que mediante el uso de moléculas térmicamente excitadas, es decir, que no utilizan un campo eléctrico de DC para crear propagación, el sistema detector de membrana-MCP también puede sondear los llamados neutros, es decir, moléculas que no están cargadas o son difícil de ionizar con MALDI. Obviamente, el sistema detector de membrana-MCP abre una amplia gama de esquemas de detección de moléculas altamente sensibles con un posible gran impacto en el campo del análisis de masa de proteínas y, por lo tanto, de la proteómica.

Ejemplo 2

35

El mecanismo de detección global puede separarse en tres eventos diferentes:

(a) impacto de la molécula (tal como una proteína cargada), (b) generación de fonones balísticos o fonones no balísticos (tal como fonones acústicos) en la membrana semiconductor, y finalmente (c) emisión de un electrón a través de túnel asistido por fonones desde la capa emisora. Dependiendo de las condiciones de polarización y de la estructura mecánica y electrónica detallada del detector, es posible generar no solo un solo electrón sino una multitud de electrones, es decir, el dispositivo puede operar con grandes ganancias. Los electrones generados fueron detectados posteriormente por un detector de electrones MCP convencional o por una pantalla fluorescente. La energía de los fonones excitados es proporcional a la masa y, por lo tanto, al impulso transferido por la molécula. Eso asegura que se midió la masa acelerada, que es proporcional a la energía de impacto y, por lo tanto, a la energía de los fonones excitados.

En un enfoque directo, la energía total de las proteínas está determinada por la energía que adquieren en el campo eléctrico de DC de la unidad MALDI. Esto da como resultado una energía cinética de la proteína de $E = \frac{1}{2} mv^2$, donde nuevamente m es la masa de la proteína y v su velocidad final. Esto proporciona la cantidad máxima de energía para un fonón que se excita en el detector. Los voltajes de aceleración habituales en una cámara MALDI/TOF son del orden de 10 kV, lo que se traduce en frecuencias de fonón de orden 3000 PHz. Para energías de aceleración más moderadas en el orden de $E_{DC-campo} = 1.24$ eV, la energía de fonón posible seguirá siendo muy alta, con aproximadamente $E_{ph} = h \times 300$ THz (como de costumbre, h indica el cuanto de Planck). La energía suministrada por el campo eléctrico será el límite superior para las posibles excitaciones del detector. La molécula cargada impacta la superficie externa de la membrana con una energía grande, lo suficientemente grande como para excitar fonones balísticos incluso a temperatura ambiente (la energía térmica a temperatura ambiente simplemente está dada por $E_{térmica} = k_B T = k_B (300 \text{ K}) = 26 \text{ meV} = h (6 \text{ THz})$, con k_B que denota la constante de Boltzmann).

60

En contraste con los detectores de estado sólido clásicos tales como los sistemas MCP estándar, el presente detector tiene una delgadez notable (preferiblemente la membrana semiconductor está entre 50 y 300 nanómetros). Esto asegura las vibraciones mecánicas (fonones) generadas por el impacto de una partícula, tal como una proteína acelerada, no están completamente termalizados en fonones de baja energía como en los detectores calorimétricos clásicos, pero preferiblemente se transmiten como fonones balísticos de alta energía (balísticos significa que viajan sin experimentar dispersión). Los fonones excitados con energías de varios THz viajan a través de la membrana y

65

posteriormente a la capa emisora, donde inducen la emisión de electrones al vacío. La suposición de la propagación balístico-fonónica se justifica para membranas lo suficientemente delgadas, ya que la trayectoria libre media de fonones en Si y SiN es del orden de 300 nanómetros a temperatura ambiente. Con una energía de impacto típica de varias decenas de eV (que corresponde a varios 100 THz), hay suficiente energía para excitar los fonones y los electrones de seguimiento de la capa emisora.

Ejemplo 3

La fabricación de la muestra se basa en etapas de procesamiento de semiconductor estándar que implican litografía óptica, dopado del material, y etapas de grabado húmedo y seco, aunque también se pueden usar otros procesos. El procesamiento comienza desde las obleas de silicio sobre aislante (SOI). Se recibieron obleas especialmente conformadas a través de colaboradores en Soitec Corp. y UW-Madison. Las capas superiores de silicio de las obleas SOI fueron dopadas o enviadas a fuentes externas para un alto nivel de dopaje tipo n- y/o p-. En la primera secuencia de litografía óptica, se definieron conductores metálicos y se prepararon ambos lados de la oblea para los pasos de grabado subsiguientes. Con el fin de definir membranas independientes hechas de silicio o nitruro de silicio, se usó una etapa de grabado en húmedo con KOH. Esto abre ventanas desde la parte posterior de la oblea y solo deja finas a las membranas ultradelgadas.

Un ejemplo de tal membrana muy delgada (200 nm) se muestra en la Figura 5, donde se aplicó el procesamiento de obleas enteras. Como se ve, las membranas de la Figura 5 (nueve cuadrados) son semitransparentes a la luz. El propio material de membrana puede estar hecho actualmente de heteroestructuras de silicio, silicio-nitruro o silicio-germanio (SiGe). La tensión dentro de las membranas se diseñó ajustando el espesor de la capa y la composición de la estructura SiGe. Finalmente, el lado superior de las membranas está modelado por una combinación de litografía óptica y de haz de electrones y grabado en seco en grabadoras reactivas de iones (RIE). La litografía por haz de electrones actualmente permite que las características en una oblea de 2" se definan en tan solo 30 nanómetros.

Además de usar silicio y otros elementos del grupo IV, las membranas pueden fabricarse a partir de materiales de partida de diamante sobre SOI dopados. Las ventajas aparentes del diamante son la energía extremadamente baja requerida para la emisión de electrones en el campo y su resistencia mecánica. Esto permitirá que se utilicen voltajes operativos más bajos e incrementará el tamaño de la membrana.

Ejemplo 4

Para probar el detector de prototipo, se configuró un sistema MALDI/TOF como se muestra en la figura 6. El sistema incluía componentes relevantes como se conoce en la técnica: cámaras de vacío, bombas, láser para MALDI, computadora de medición, MCP, pantalla fluorescente y una cámara CCD de alta resolución para lectura. Los principios de funcionamiento del presente detector no requieren bajas temperaturas, ya que las energías del fonón que se va a detectar son de varios 10 THz, mucho más grandes que la correspondiente energía de temperatura ambiente de $E_{th} = h \times 6 \text{ THz}$. Sin embargo, un "dedo frío" se integró en la configuración. Esta unidad permite alcanzar temperaturas de hasta 4 K. La unidad de medida es, por lo tanto, extremadamente flexible y puede proporcionar información sobre el rendimiento del detector en un amplio rango de temperatura. Además, las ventanas ópticas están integradas en la unidad TOF de la configuración. Estas ventanas permiten el acceso óptico a la membrana semiconductor que soporta la generación de electrones a través de la iluminación con un láser. Otro puerto óptico da acceso a la parte posterior de la membrana, lo que permite la eliminación de las proteínas que han sufrido ablación después de la detección mediante un pulso de calor por láser.

Para llevar a cabo las mediciones con proteínas ionizadas, se utilizó la detección tradicional de MALDI/TOF, es decir, ionizando las moléculas y detectando su impacto medido por el tiempo de vuelo (detector de modo TOF para observar la detección de la carga de la molécula). Después de esto, se usa el modo TOF para detección de fonones en el cual la molécula impactante generará fonones, que a su vez causan la emisión de electrones. Estos dos métodos (carga y detección de masa) se combinan y calibran con la ayuda de soluciones de prueba equimolares (péptidos más grandes de masas conocidas). Finalmente, se usa el "modo de resolución de energía", donde el número de electrones emitidos es proporcional a la energía del fonón excitado y, por lo tanto, a la masa de la molécula.

La Figura 7 muestra un espectro de masas de angiotensina obtenido usando un detector de la presente invención. De forma similar, las Figuras 8 y 9 muestran un espectro de masas de insulina bovina obtenido usando un detector de la presente invención, y la Figura 10 muestra un espectro de masa del citocromo C obtenido usando un detector de la presente invención. La Figura 11 muestra un espectro del tiempo de vuelo de la insulina obtenida usando un detector de la presente invención. La figura 9 muestra que la señal del detector tiene menos resolución ($m/\Delta m = 82.722$) que la mostrada en otras figuras, sin embargo, incluso a menor resolución, el detector todavía puede detectar la molécula de insulina bovina. La membrana de la Figura 9 está parcialmente rota, de modo que los iones golpean directamente al detector. Esta figura sirve como una comparación de la resolución y subraya el hecho de que en este rango de baja masa el detector aún puede ser efectivo. Las Figuras 7, 8 y 10 muestran el verdadero potencial de la presente invención con resoluciones de órdenes de magnitud mejores que la configuración típica de

MALDI/TOF-MCP ($m/\Delta m$ mayor que 2.500, 9.000 y 10.000). Los dos picos mostrados en las figuras se deben a las dos polarizaciones longitudinales diferentes de los fonones acústicos en la membrana. Las distancias de pico relativas aumentan con masas más altas, como se esperaba para una relación de dispersión lineal de fonones acústicos.

La detección de proteínas con este detector se basa en la excitación de fonones balísticos por parte de las proteínas que golpean la membrana, lo que conduce a un túnel asistido por fonones (PAT) para que los electrones en la capa de emisión se emitan al vacío. Estos electrones se detectan a través de un MCP y una pantalla fluorescente, que permite la detección en tiempo real desde un área de detector de membrana a gran escala. Las membranas semiconductoras hechas de silicio y membranas de nitruro de silicio constituyen una membrana pasiva. Se logra ganancia activa, una vez que la membrana está hecha de silicio dopado, formando una unión pn incrustada, o usando una membrana en la que está incrustada una heteroestructura.

Ejemplo 5

En un conjunto de experimentos, las mediciones en la membrana del detector para determinar masas de proteínas indicaron un modo específico de operación, que se detalla a continuación: las membranas semiconductoras (hechas de nitruro de silicio) que tienen un espesor de 45 nm y capas de metal delgadas (~20-40 nm) en el lado frontal y posterior están polarizadas eléctrica y mecánicamente, de modo que la emisión de campo se puede aplicar como un medio para detectar las vibraciones de la membrana. La polarización eléctrica se refiere a establecer un voltaje en el rango de 100-2000 V entre la membrana y el electrodo de la cuadrícula (en la parte posterior del detector, es decir, no el lado expuesto al bombardeo de proteínas). La polarización mecánica se refiere a la sujeción de todo el chip detector en el soporte, donde el aumento de la presión mecánica conduce a un abombamiento de la membrana. Con estos dos esquemas de polarización, el detector se lleva al punto de funcionamiento donde se ve una corriente de emisión de campo bajo en el amplificador de electrones MCP intercalado.

El punto crucial del mecanismo de detección descrito aquí es que la membrana está realizando vibraciones mecánicas de bajo desplazamiento. La frecuencia de estas vibraciones está determinada por el tamaño lateral de las membranas y las constantes elásticas del material. En detalle, esto se puede estimar con la frecuencia fundamental para una membrana con pinza rectangular:

$$f = (1/2) C_s \sqrt{(n/a)^2 + (m/b)^2}$$

siendo C_s la velocidad del sonido, a y b las longitudes laterales, y dando n y m los números modales específicos (el modo base está en $n = m = 1$). En este caso, se obtuvieron frecuencias en el rango de 4 - 20 MHz.

Cuando una proteína golpea la membrana del detector, induce oscilaciones de gran amplitud de los modos de membrana mecánicos fundamentales. Estas oscilaciones se revelan en la corriente MCP. Como se muestra en la Figura 13 usando albúmina de suero bovino con carga simple (BSA 1+) y albúmina de suero bovino doblemente cargada (BSA 2+), las oscilaciones de pequeña amplitud se mejoran drásticamente en el modo de detección real. Dependiendo de la masa y/o el número de proteínas, los tiempos de relajación de estas oscilaciones varían (ver Figura 14). Por ejemplo, aunque las proteínas BSA 1+ y BSA 2+ poseen la misma masa, el número total de proteínas BSA cargadas doblemente es mucho menor que el de BSA con carga única. Esto se debe al proceso MALDI utilizado en el arreglo. En los puntos de polarización, está presente una "corriente oscura" (que puede ajustarse). Una vez que una proteína llega a la membrana, esta corriente particular comienza a oscilar, donde la frecuencia de las oscilaciones sigue la ecuación anterior. Como se muestra en la Figura 15, se observaron oscilaciones idénticas que subrayaban las suposiciones mencionadas anteriormente para diferentes masas (picos en el espectro). La amplitud de la modulación es una función del momento de la partícula $p = mv$, donde m es la masa de la proteína y v su velocidad. Además, la señal depende del número de proteínas N de una determinada masa que golpea la membrana. Por lo tanto, la amplitud total de las oscilaciones de la membrana es proporcional a Np . Esto se ilustra en la Figura 16, donde se comparan los tiempos de relajación de oscilación de una variedad de picos.

Habiendo descrito ahora completamente la presente invención en algún detalle a modo de ilustración y ejemplos para fines de claridad de comprensión, será obvio para un experto en la técnica que lo mismo se puede realizar modificando o cambiando la invención dentro de un rango amplio y equivalente de condiciones, formulaciones y otros parámetros sin afectar el alcance de la invención o cualquier realización específica de la misma, y que tales modificaciones o cambios pretenden estar abarcados dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Un experto en la materia apreciará que los materiales de partida, reactivos, métodos de purificación, materiales, sustratos, elementos del dispositivo, métodos analíticos, métodos de ensayo, mezclas y combinaciones de componentes distintos de los ejemplificados específicamente pueden emplearse en la práctica de la invención sin recurrir a una experimentación indebida. Todos los equivalentes funcionales conocidos en la técnica de cualquiera de tales materiales y métodos están destinados a ser incluidos en esta invención. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de que en el uso de dichos términos y expresiones se excluyan los equivalentes de las características mostradas y descritas o partes de

las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, debe entenderse que aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos aquí divulgados, y que tales modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente documento, "comprender" es sinónimo de "incluir", "contener" o "caracterizado por", y es inclusivo o abierto y no excluye elementos no enumerados o pasos del método adicionales. Como se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de reivindicación. Tal como se usa en la presente memoria, "que consiste esencialmente en" "no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación. En cada uno de los casos, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser reemplazado por cualquiera de los otros dos términos.

Cuando se describe aquí un grupo de materiales, composiciones, componentes o compuestos, se entiende que todos los miembros individuales de esos grupos y todos sus subgrupos se describen por separado. Cuando se usa aquí un grupo Markush u otra agrupación, se pretende que todos los miembros individuales del grupo y todas las combinaciones y subcombinaciones posibles del grupo se incluyan individualmente en la divulgación. Cada formulación o combinación de componentes descritos o ejemplificados en la presente memoria se puede usar para practicar la invención, a menos que se indique lo contrario. Cuando se da un rango en la especificación, por ejemplo, un rango de temperatura, un rango de tiempo o un rango de composición, todos los intervalos intermedios y subintervalos, así como todos los valores individuales incluidos en los rangos dados, están destinados a ser incluidos en la divulgación. En la descripción y las reivindicaciones, "y/o" significa adicional o alternativamente. Además, cualquier uso de un término en singular también abarca formas plurales.

Todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad en la medida en que no haya incoherencia con la divulgación de esta especificación. Algunas referencias proporcionadas en este documento se incorporan por referencia para proporcionar detalles sobre las fuentes de materiales de partida, materiales de partida adicionales, reactivos adicionales, métodos adicionales de síntesis, métodos adicionales de análisis, materiales biológicos adicionales, péptidos adicionales, péptidos químicamente modificados, células adicionales y más usos de la invención. Todos los títulos utilizados en este documento son solo por conveniencia. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de habilidad de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención, y se incorporan aquí como referencia en la misma medida que si cada publicación individual, patente o solicitud de patente fuera específica e individualmente indicada para ser incorporada como referencia. Las referencias citadas en este documento se incorporan aquí como referencia en su totalidad para indicar el estado de la técnica a partir de su publicación o fecha de presentación y se pretende que esta información se pueda emplear aquí, si es necesario, para excluir realizaciones específicas que están en la técnica anterior. Por ejemplo, cuando se reivindica la composición de la materia, debe entenderse que los compuestos conocidos y disponibles en la técnica antes de la invención del Solicitante, que incluyen compuestos para los que se proporciona una divulgación habilitante en las referencias citadas en este documento, no están destinados a ser incluidos en la composición de la materia reivindicada aquí.

REIVINDICACIONES

1. Un detector (1) para detectar moléculas, comprendiendo dicho detector (1):

5 una membrana (2) semiconductor que tiene una superficie (4) externa para recibir dichas moléculas, y una superficie (7) interna situada opuesta a dicha superficie (4) externa,

en el que dicha membrana (2) semiconductor tiene un espesor de 5 nanómetros a 50 micras;

10 una capa (3) emisora de electrones que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en metales, semiconductores dopados y materiales de diamante dopados provistos en la superficie (7) interna de dicha membrana (2) semiconductor, donde dicha capa (3) emisora tiene un espesor de 5 nanómetros a 10 micras, y

15 un detector (5) de electrones posicionado para detectar al menos una porción de dichos electrones (8) emitidos, donde dicha capa (3) emisora emite electrones (8) cuando dicha membrana (2) semiconductor recibe dichas moléculas, y en donde el detector (1) está libre de nanopilares unidos a la membrana (2) semiconductor.

20 2. El detector (1) de la reivindicación 1, en el que dicha capa (3) emisora está polarizada eléctricamente aplicando un voltaje de -3000 V a 3000 V a dicha capa (3) emisora y/o dicha superficie (4) externa de dicha membrana (2) semiconductor es polarizada eléctricamente por aplicación de un voltaje de -2000 V a 2000 V a dicha membrana (2) semiconductor y/o dicho electrodo (9) es un electrodo de cuadrícula polarizado eléctricamente por aplicación de un voltaje de -2000 V a 2000 V a dicho electrodo (9).

25 3. El detector (1) de la reivindicación 1, en el que dicha capa (3) emisora tiene un espesor de 5 nanómetros a 25 nanómetros y/o dicha membrana (2) semiconductor comprende una pluralidad de capas de uno o más materiales semiconductores, en donde cada una de dichas capas tienen espesores de 1 nanómetro a 1000 nanómetros y/o dicha membrana (2) semiconductor tiene un espesor de 50 nanómetros a 300 nanómetros y/o dicha membrana (2) semiconductor comprende además una capa (10) protectora proporcionada en la superficie (4) externa, en donde dicha capa (10) protectora tiene un espesor de 5 nanómetros a 25 nanómetros.

30 4. El detector (1) de la reivindicación 1, en el que dicha capa (3) emisora es una capa metálica que recubre de manera conformable al menos una parte de la superficie (7) interna de dicha membrana (2) semiconductor.

35 5. El detector (1) de la reivindicación 1, en el que dicha membrana (2) semiconductor se proporciona a una temperatura de 2 K a 600 K.

40 6. El detector (1) de la reivindicación 1, en el que dicha membrana (2) semiconductor comprende uno o más materiales semiconductores seleccionados del grupo que consiste en semiconductores de Si, Ge, SiN, diamante sobre aislante y combinaciones de los mismos.

45 7. El detector (1) de la reivindicación 1, que comprende además un sustrato que tiene una o más áreas detectoras activas, en el que cada área detectora activa comprende dicha membrana (2) semiconductor y dicha capa (3) emisora, en donde la membrana (2) semiconductor de cada área detectora activa tiene un área superficial de 0.1 milímetros² a 20² centímetros² y/o comprende además un analizador de masas seleccionado del grupo que consiste en un analizador de masas cuadrupolar, analizador de masas de sector magnético, analizador de masas de tiempo de vuelo y analizador de masas de trampa de iones y/o que comprende adicionalmente un electrodo posicionado entre dicha superficie interna de dicha membrana y dicho detector de electrones.

50 8. El detector (1) de la reivindicación 1, en el que dichas membrana (2) semiconductor y capa (3) emisora se combinan para proporcionar un espesor combinado uniforme que no varía en más del 20% sobre un área activa del detector (1).

55 9. El detector de la reivindicación 1, en el que el espesor combinado de dicha membrana (2) semiconductor y dicha capa (3) emisora tiene un espesor combinado que no varía en más de 5%.

60 10. El detector (1) de la reivindicación 1, donde dicho detector (5) de electrones comprende una o más placas (11) de microcanal o un dínodo posicionado en la trayectoria de los electrones (8) emitidos por dicha capa (3) emisora donde dicho detector (5) de electrones comprende además una pantalla fotoluminiscente y un fotodetector, en el que dicha pantalla fotoluminiscente recibe dichos electrones (8) de dichos resonadores y genera radiación electromagnética que es detectada por dicho fotodetector.

11. Un método para detectar moléculas que comprende los pasos de:

proporcionar un detector (1) que comprende:

65

una membrana (2) semiconductor que tiene una superficie (4) externa para recibir dichas moléculas, y una superficie (7) interna situada opuesta a dicha superficie (4) externa,

en el que dicha membrana (2) semiconductor tiene un espesor de 5 nanómetros a 50 micras,

una capa (3) emisora de electrones que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en metales, semiconductores dopados y diamantes dopados provistos en la superficie (7) interna de dicha membrana (2) semiconductor, donde dicha capa (3) emisora tiene un espesor de 5 nanómetros a 10 micrómetros, y en el que dicha capa (3) emisora emite electrones (8) cuando dicha membrana (2) semiconductor recibe dichas moléculas, y

donde;

poner en contacto dichas moléculas con la superficie (4) externa de dicha membrana, y

detectar electrones (8) emitidos en donde dicho detector (1) está libre de nanopilares unidos a la membrana (2) semiconductor y en el que dicho contacto de dichas moléculas con la superficie (4) externa de dicha membrana genera electrones (8) emitidos por dicha capa (3) emisora

12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho detector (1) tiene áreas de detector activo, en el que cada área de detector activo comprende dicha membrana (2) semiconductor y dicha capa (3) emisora de electrones.

13. El método según la reivindicación 12, en el que la etapa de método que pone en contacto las moléculas con la superficie (4) externa de dicha membrana (2) es seguida por etapas adicionales del método b1) convirtiendo la energía cinética de dichas moléculas en contacto con la superficie (4) externa en vibraciones reticulares de la membrana (2) semiconductor para generar fonones y b2) transferir dichos fonones a dicha capa (3) emisora generando de ese modo electrones de la capa emisora en respuesta a dicha transferencia de electrones.

14. El método de la reivindicación 11, que comprende además polarizar eléctricamente dicha capa (3) emisora, dicha capa semiconductor o ambas con el fin de generar emisión de campo, emisión secundaria de electrones o ambas a partir de dicha capa (3) emisora, donde dicha capa (3) emisora es polarizada eléctricamente usando un electrodo de cuadrícula al menos parcialmente transmisivo proporcionado lo suficientemente cerca de dicha capa (3) emisora para establecer un potencial eléctrico en dicha capa (3) emisora seleccionada en el rango de - 2000 V to 2000 V.

15. El método de la reivindicación 11, en el que dichas moléculas son iones, dicho método comprende además acelerar dichos iones para impactar dicha superficie (4) externa que tiene una energía cinética de 10 a 50 keV.

16. El método de la reivindicación 11, en el que dichas moléculas tienen una masa de al menos 100 kDa.

17. El método de la reivindicación 11, en el que dicho método se lleva a cabo a una temperatura de 2 K a 600 K.

18. El método de la reivindicación 11, en el que dicha etapa de detección de electrones (8) emitidos comprende la etapa de proporcionar un detector (5) de electrones en la ruta de al menos una porción de dichos electrones (8) emitidos, donde dicho detector (5) de electrones comprende una placa (11) de microcanal o un dínodo y/o donde dicha etapa de detección de electrones (8) emitidos comprende amplificar dichos electrones (8) desde dicha capa (3) emisora usando una placa (11) de microcanal o dínodo.

19. El método de la reivindicación 11, en el que dicha membrana (2) semiconductor y capa (3) emisora se combinan para proporcionar un espesor combinado uniforme que no varía en más del 20% sobre un área activa del detector (1).

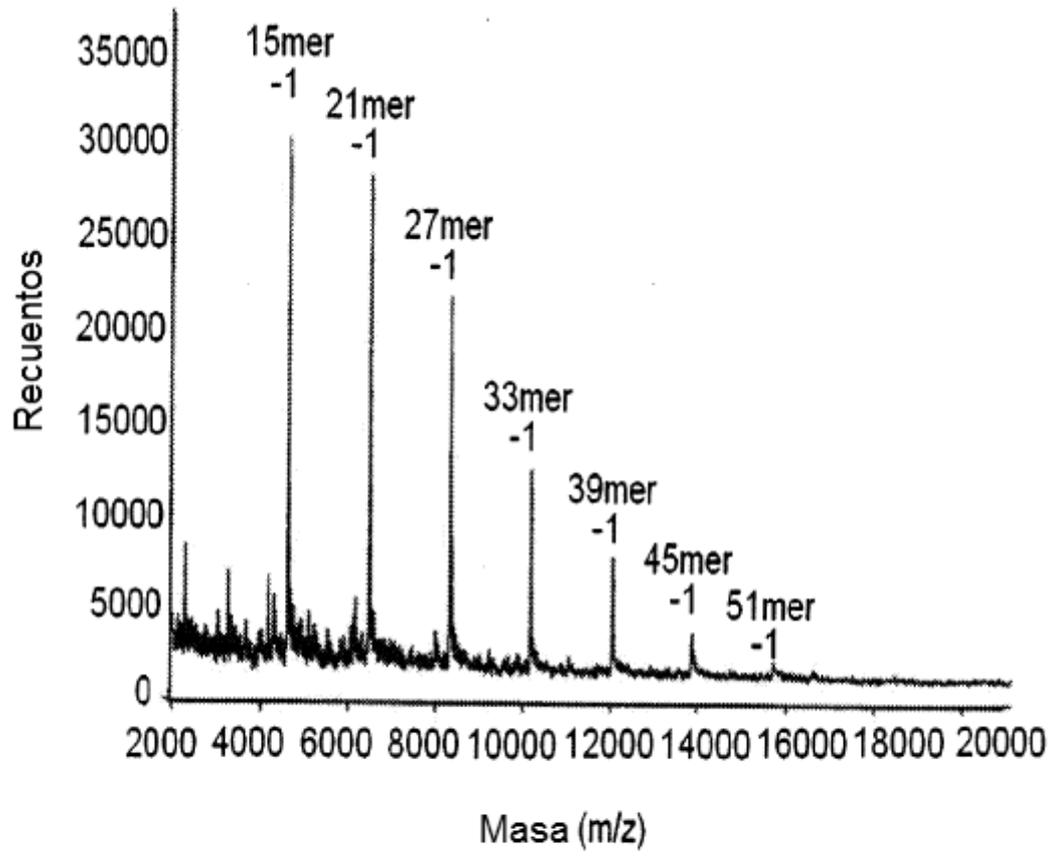


FIG. 1

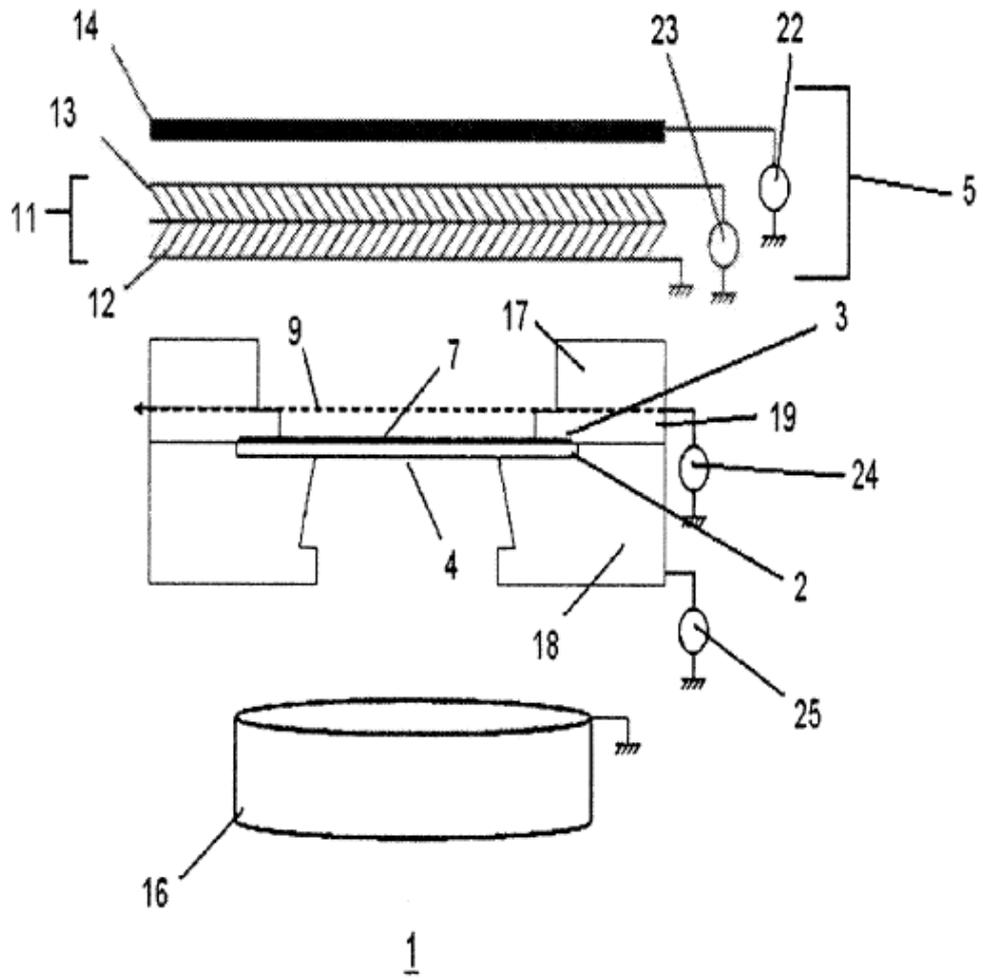


FIG. 2

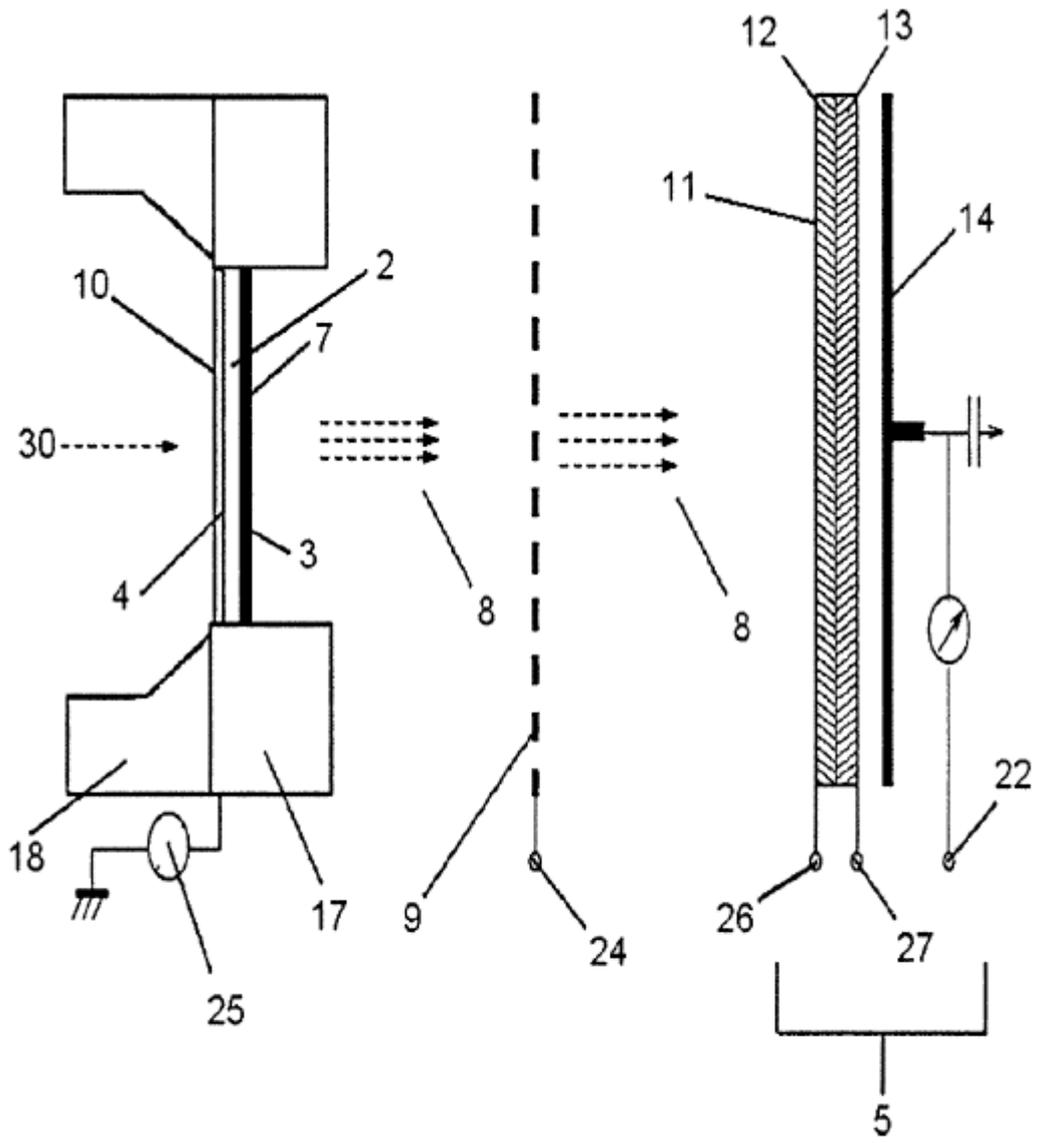


FIG. 3

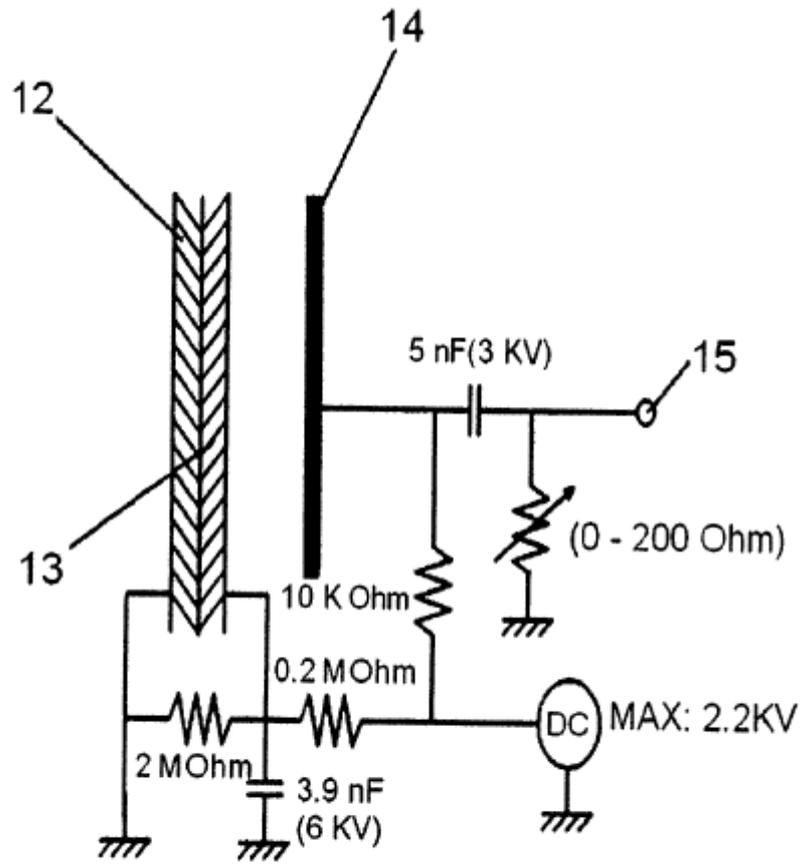


FIG. 4

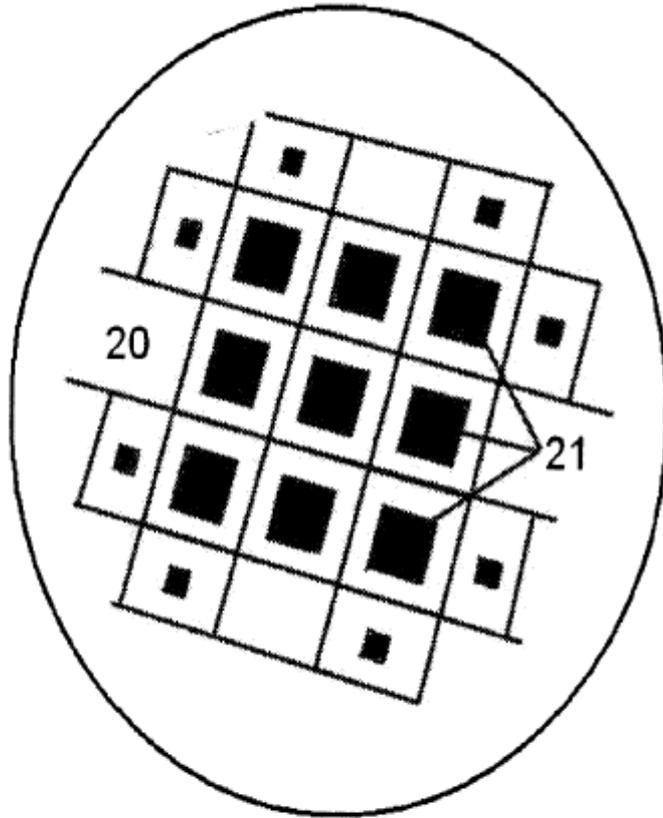


FIG. 5

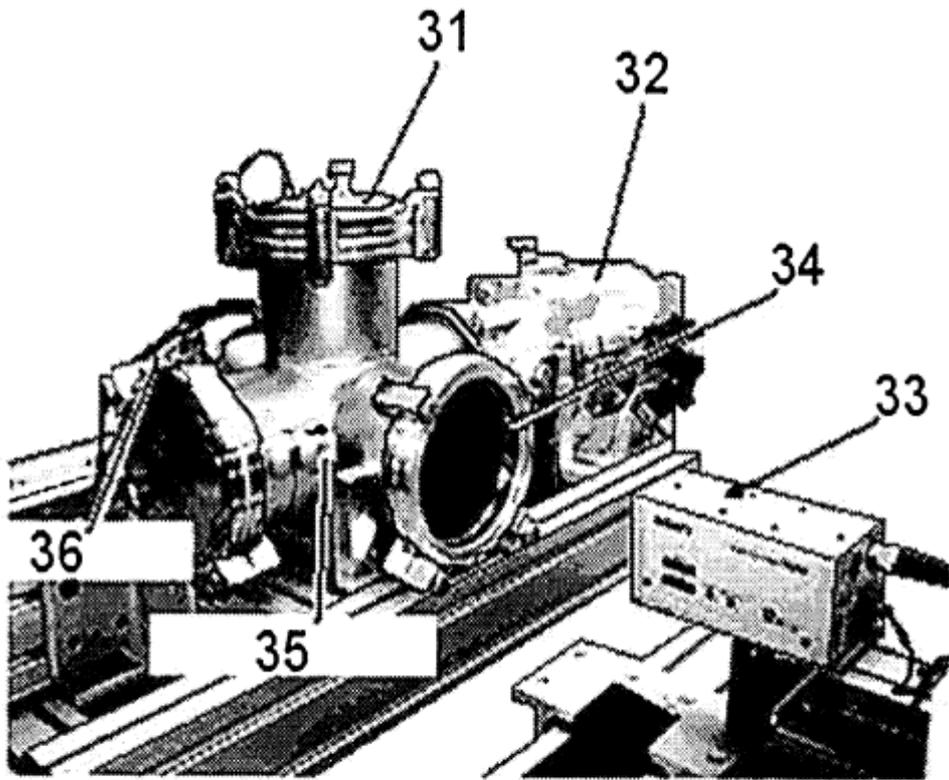


FIG. 6

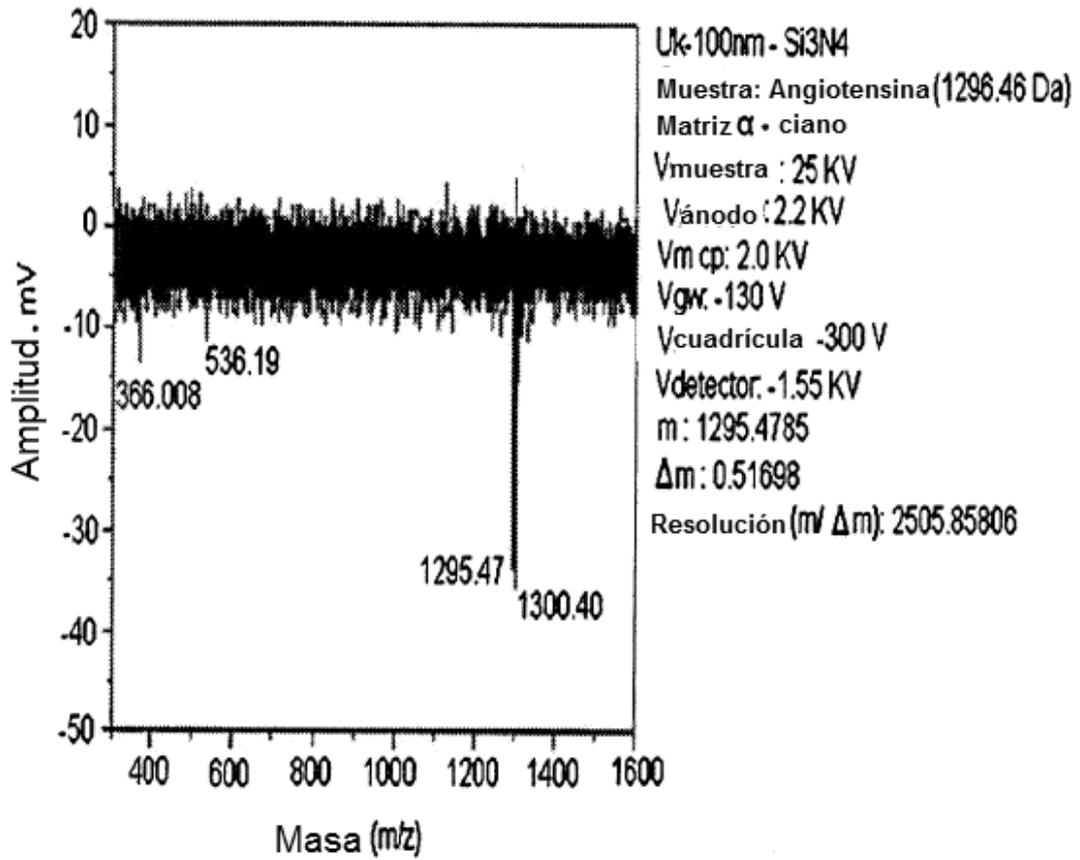


FIG. 7

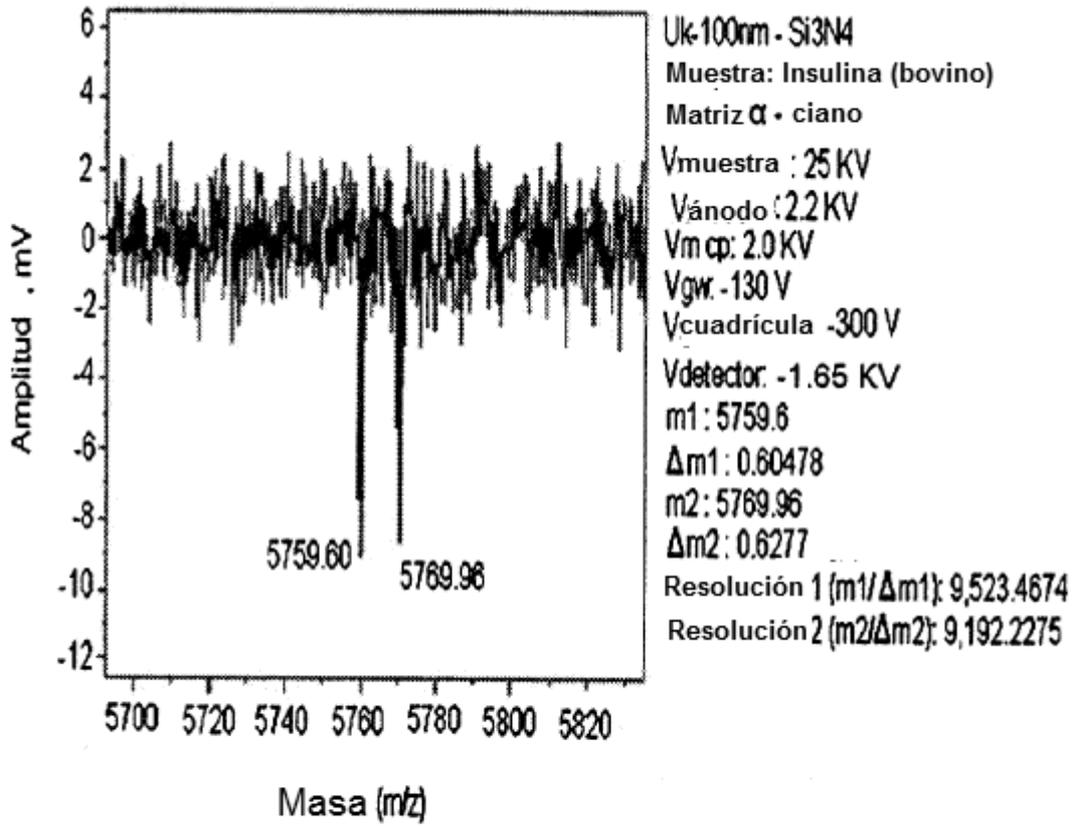


FIG. 8

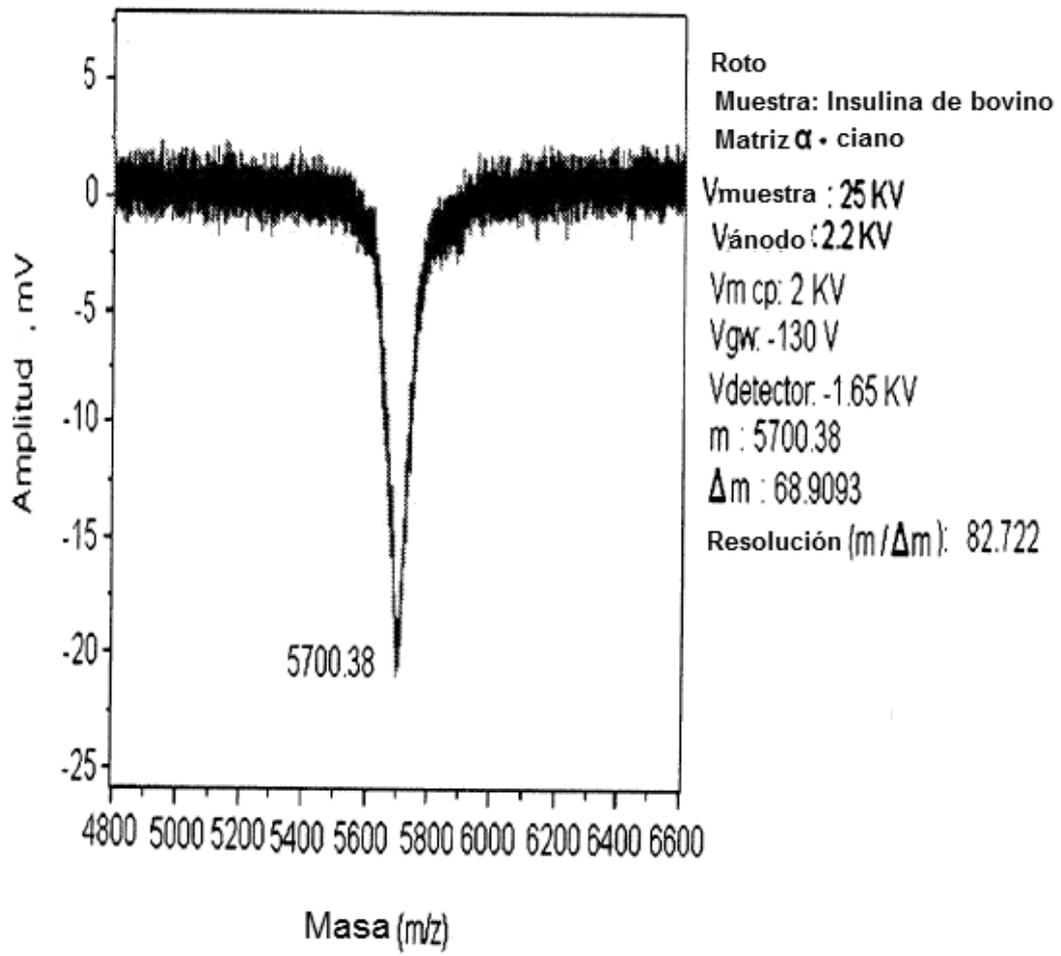


FIG. 9

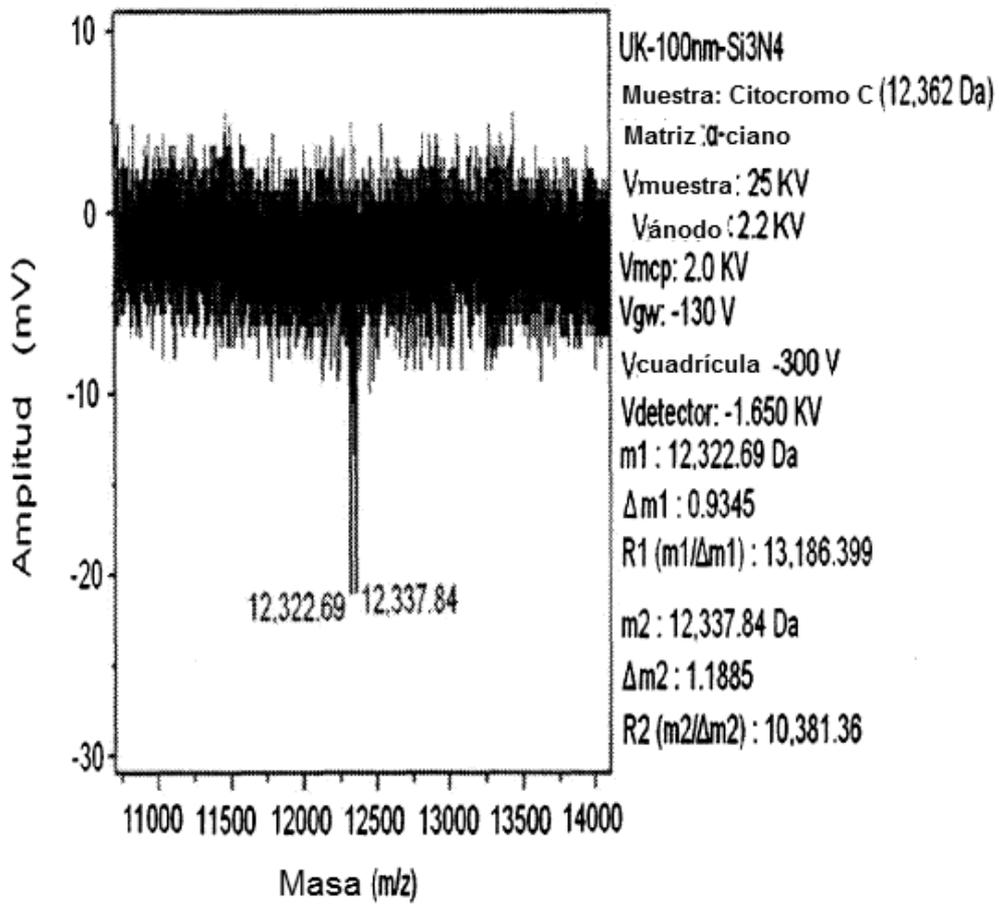


FIG. 10

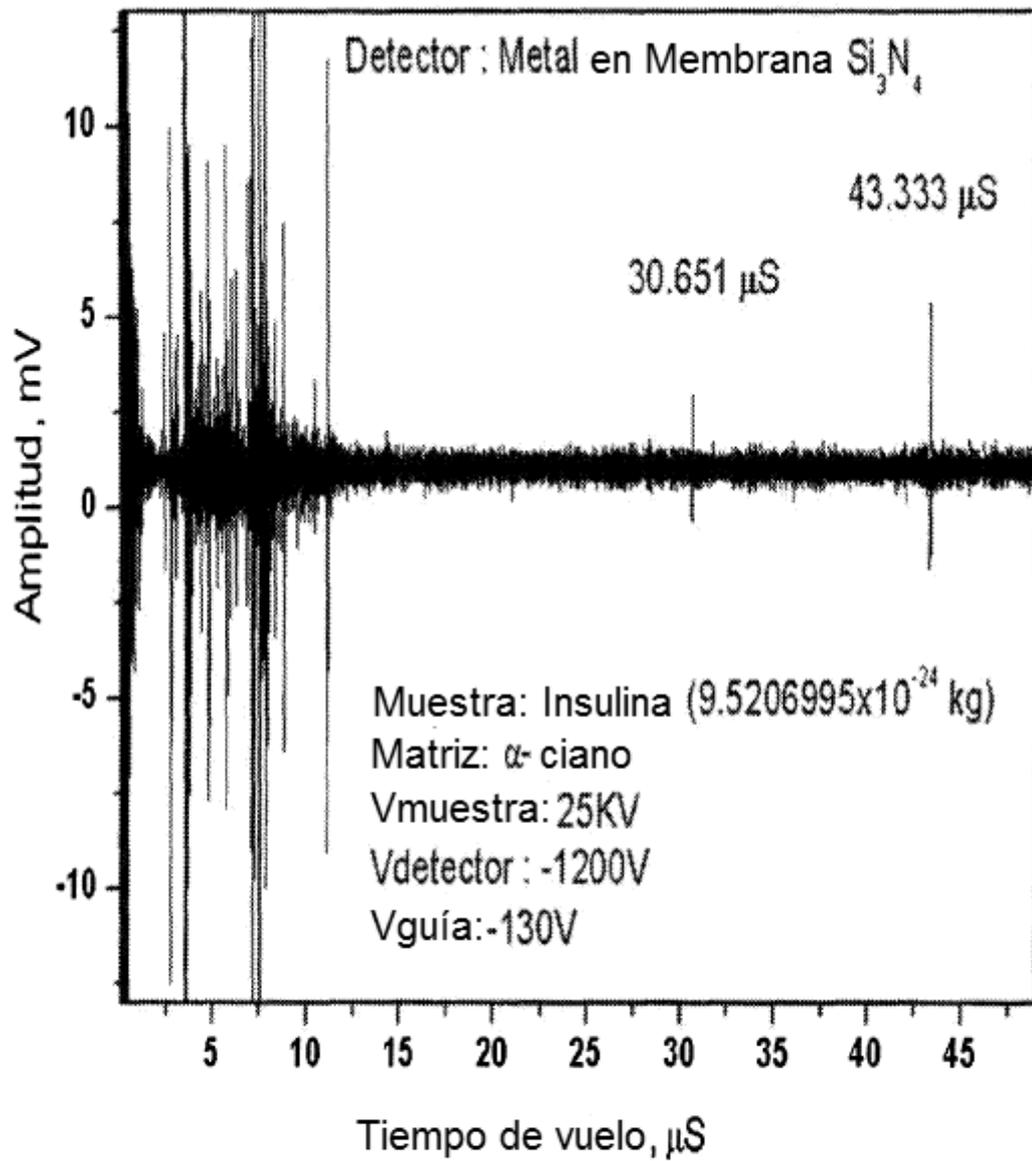


FIG. 11

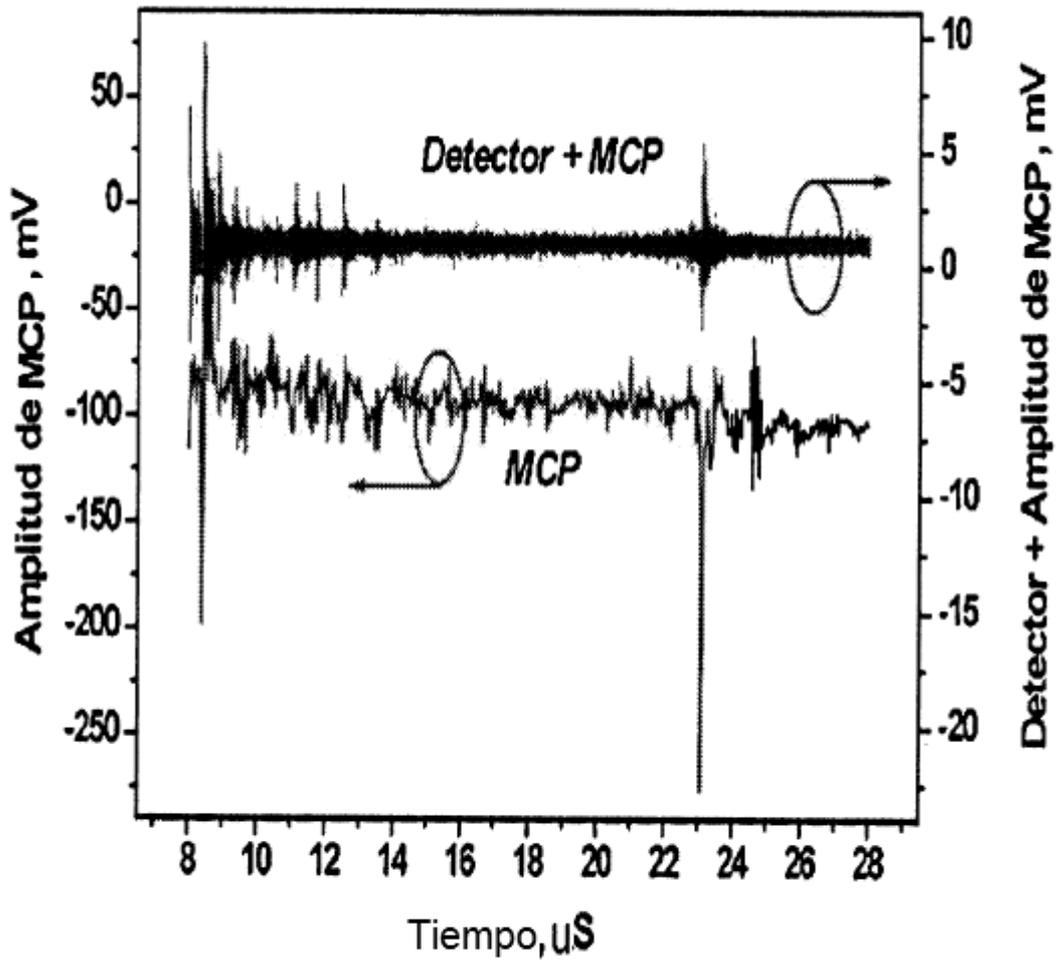


FIG. 12

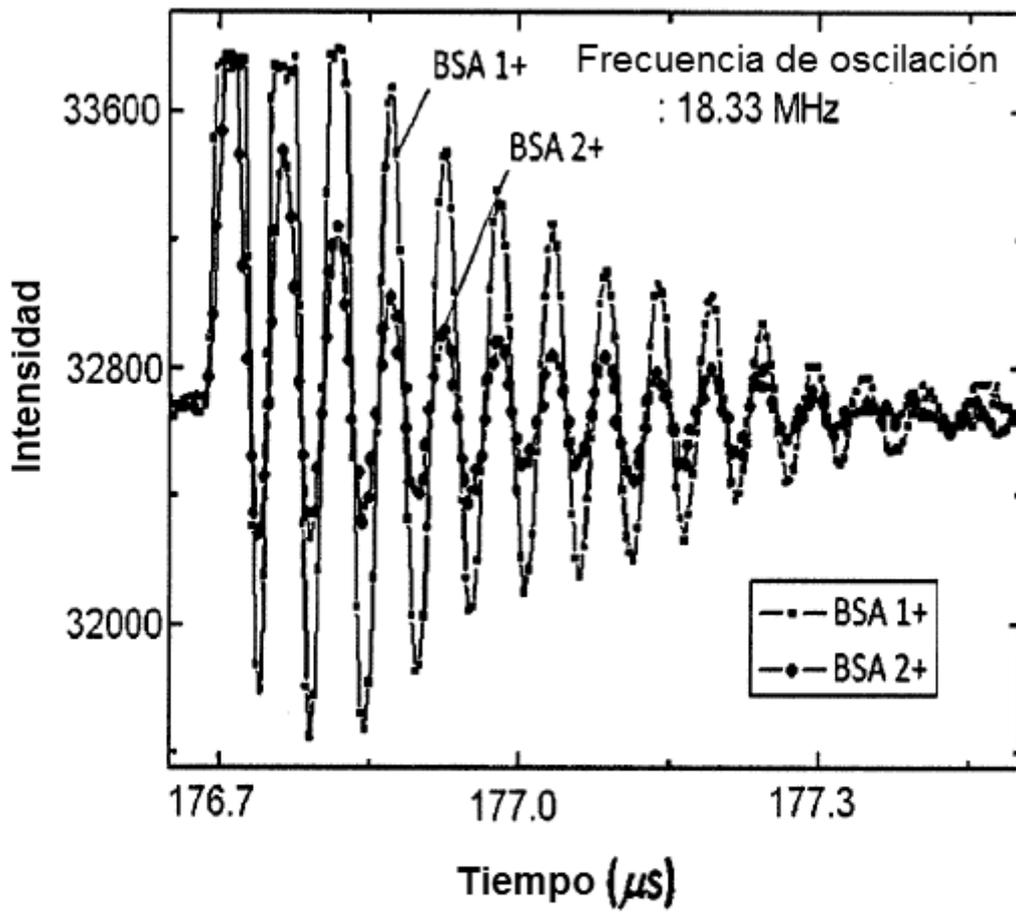


FIG. 13

Relajación para BSA1+ y BSA2+

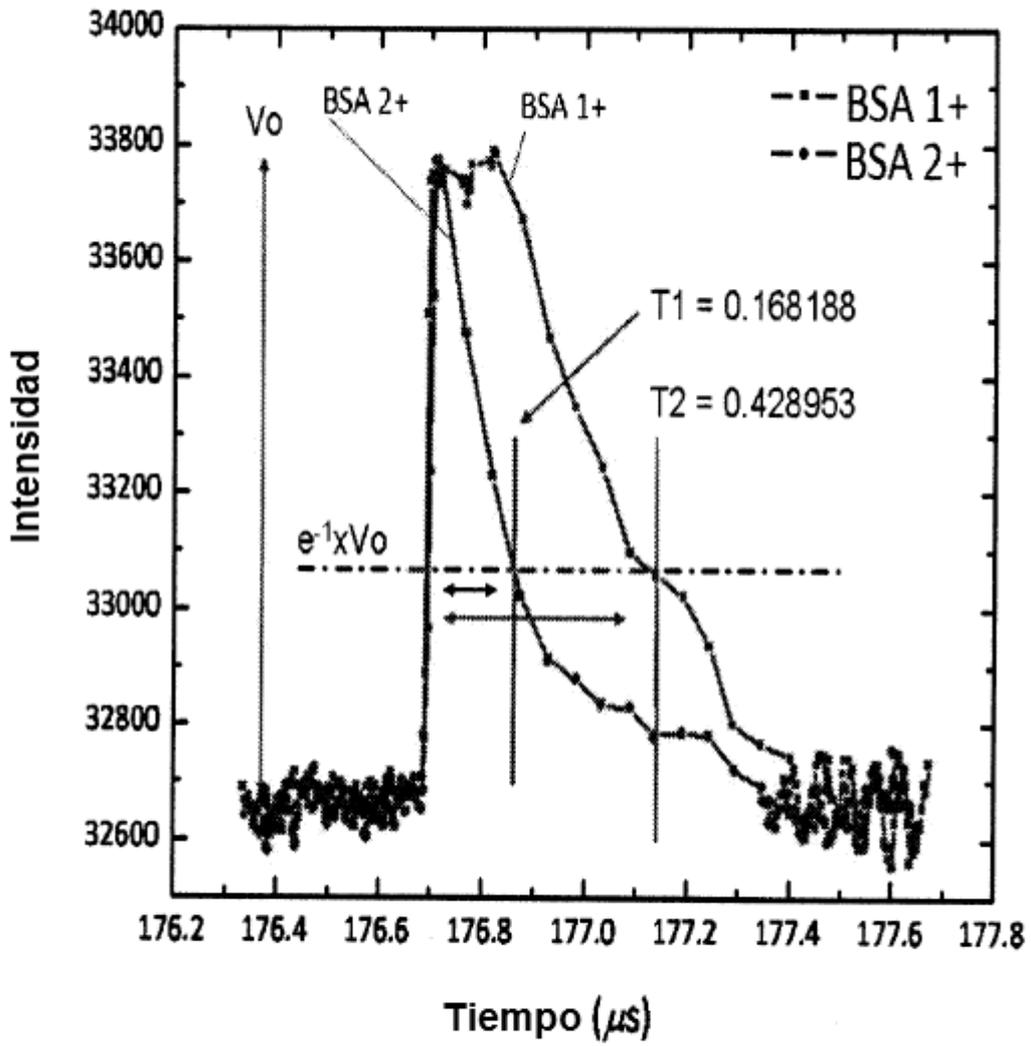


FIG. 14

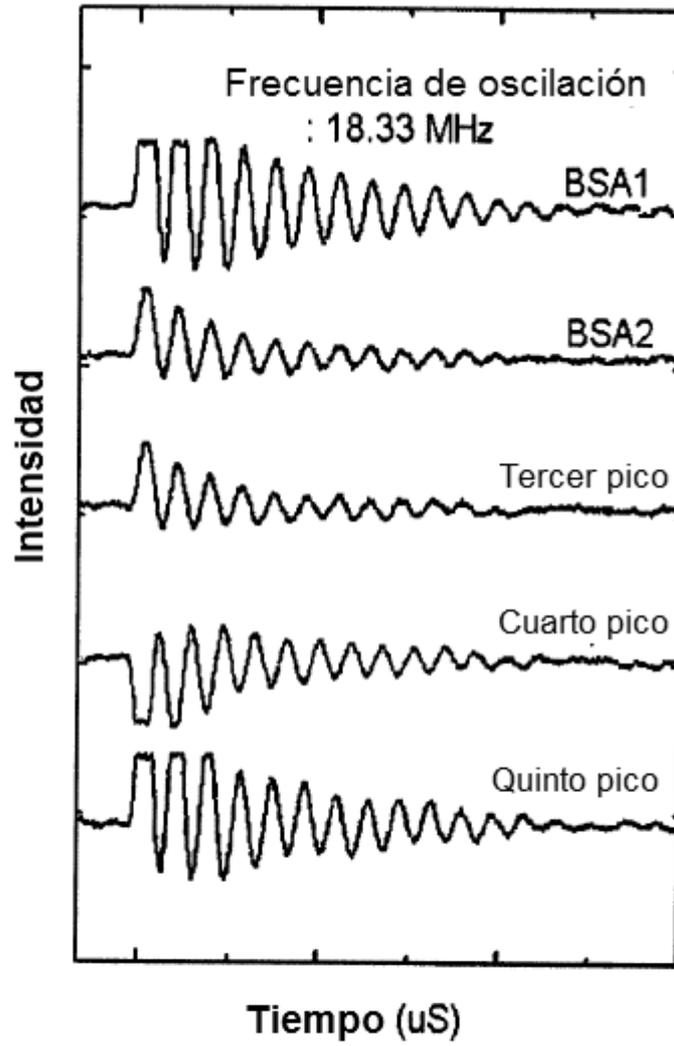


FIG. 15

Tiempo de relajación

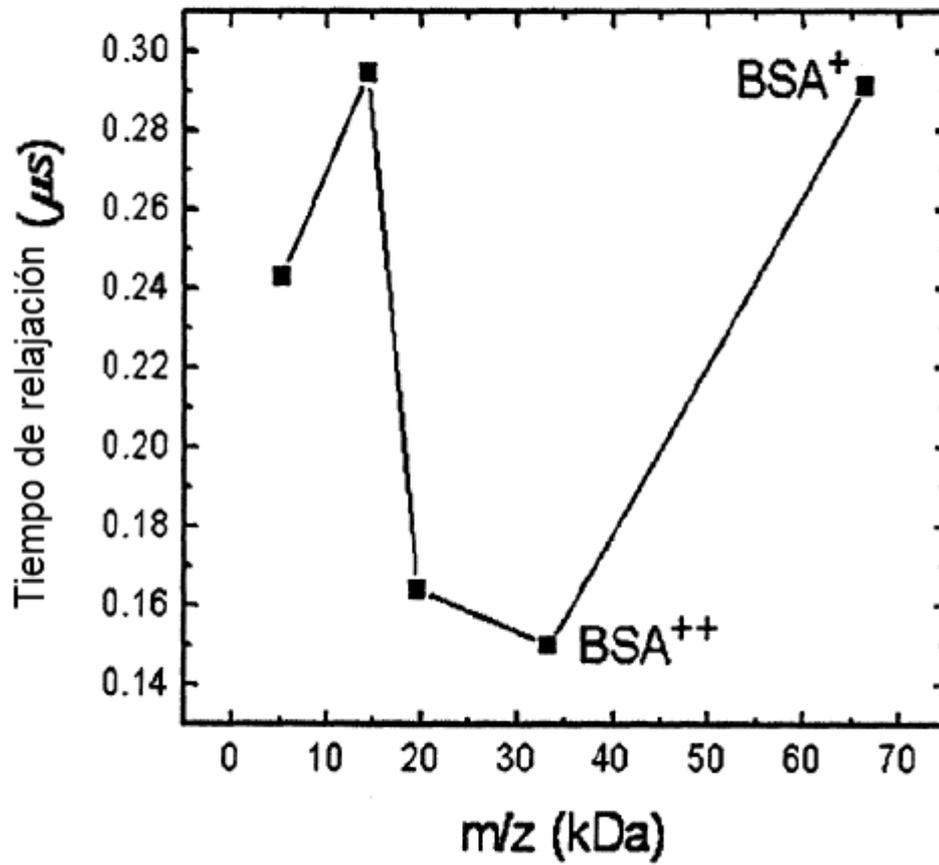


FIG. 16