(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 018 308**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6869 (2008.01)
G01N 27/327 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2018 PCT/EP2018/059837**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2018 WO18192940**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2018 E 18718451 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025 EP 3612645**

(54) Título: **Matriz de nanoporos en fase**

(30) Prioridad:

19.04.2017 US 201762487397 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2025

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

FERNANDEZ-GOMEZ, SANTIAGO y
MANNEY, J., WILLIAM

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Matriz de nanoporos en fase

Antecedentes

Los dispositivos de membrana de nanoporos que tienen tamaños de poro en el orden de un nanómetro de diámetro interno han demostrado ser prometedores en la secuenciación de nucleótidos rápida. Cuando se aplica una señal de voltaje a través de un nanoporo sumergido en un fluido conductor, el campo eléctrico puede mover iones en el fluido conductor a través del nanoporo. El movimiento de iones en el fluido conductor a través del nanoporo puede provocar una pequeña corriente de iones. El voltaje aplicado también puede mover las moléculas que se van a secuenciar hacia, a través o fuera del nanoporo. El nivel de la corriente de iones (o un voltaje correspondiente) depende de los tamaños y las estructuras químicas del nanoporo y de la molécula particular que se ha movido hacia el nanoporo.

Como alternativa a una molécula de ADN (u otra molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar) que se mueve a través del nanoporo, una molécula (por ejemplo, un nucleótido que se añade a una hebra de ADN) puede incluir una marca particular de un tamaño y/o estructura particulares. La corriente de iones o un voltaje en un circuito que incluye el nanoporo (por ejemplo, en un condensador integrador) se puede medir como una forma de medir la resistencia del nanoporo correspondiente a la molécula, permitiendo, de este modo, la detección de la molécula particular en el nanoporo, y el nucleótido particular en una posición particular de un ácido nucleico.

Un chip sensor de secuenciación basada en nanoporos puede incorporar un gran número de celdas sensoras configuradas como una matriz para la secuenciación de ADN paralela. Por ejemplo, un chip sensor de secuenciación basada en nanoporos puede incluir 100.000 o más celdas dispuestas en una matriz bidimensional para secuenciar 100.000 o más moléculas de ADN en paralelo. Puede ser difícil ajustar tantas celdas en un chip sensor sin comprometer las mediciones. También puede ser difícil hacer funcionar eficazmente los circuitos en un chip sensor de este tipo. Se muestran ejemplos de dispositivos y procedimientos conocidos en los documentos US 2014/134616 A1, US 2017/089858 A1, US 2017/089857 A1 y US 2017/091381 A1, donde se usa una señal de CA para la secuenciación con nanoporos.

Breve sumario

Las técnicas descritas en el presente documento se refieren a aplicar señales de CA con diferentes fases a diferentes grupos de celdas de nanoporo que se atienden por un mismo circuito de muestreo de datos en un chip sensor de nanoporos. Debido a las diferentes fases de las señales de CA, durante un determinado período de tiempo, un primer grupo de celdas de nanoporo puede estar en un período oscuro y no se muestrea o se muestrea mínimamente por un circuito de muestreo de datos (por ejemplo, un convertidor de analógico a digital (ADC)) para captar datos útiles, mientras que un segundo grupo de celdas de nanoporo puede estar en un período brillante y las señales de salida del segundo grupo de celdas de nanoporo se pueden muestrear por el convertidor de analógico a digital. La configuración del nivel de referencia del ADC se puede cambiar dinámicamente en base a las señales de CA aplicadas para utilizar completamente el intervalo dinámico del ADC. Las técnicas descritas en el presente documento también se pueden aplicar a sistemas que utilizan polarización de CC que cambia periódicamente, que también pueden tener un período "oscuro" cuando se recarga el electrodo.

De acuerdo con un modo de realización, un chip sensor para secuenciación de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) incluye un primer conjunto de celdas organizadas en N grupos, donde N es un número entero de dos o más. Cada celda incluye un electrodo de celda que se configura para proporcionar una señal de CA a la celda para caracterizar un nucleótido de una molécula de ácido nucleico. El chip sensor para secuenciación de ácidos nucleicos también incluye al menos N circuitos, donde cada circuito de los al menos N circuitos se configura para proporcionar una señal de CA configurable por separado a uno o más electrodos de celdas de un respectivo grupo de celdas de los N grupos de celdas, en el que los N circuitos se configuran para proporcionar señales de CA con diferentes fases a diferentes grupos de una o más celdas en los N grupos.

De acuerdo con otro ejemplo útil para entender la invención, un chip sensor para secuenciación de ácidos nucleicos incluye un conjunto de celdas. Cada celda del conjunto de celdas puede incluir un nanoporo configurado para recibir una marca conectada a un nucleótido; una membrana dentro de la que reside el nanoporo, en la que la membrana funciona como un condensador y el nanoporo como una resistencia en un circuito; un primer electrodo acoplado eléctricamente al circuito en un primer extremo de la celda; y un segundo electrodo acoplado al circuito en un segundo extremo de la celda y compartido por dos o más celdas del conjunto de celdas. El chip sensor también incluye un circuito de control configurado para aplicar una primera señal de CA a través del primer electrodo para precargar el condensador, y aplicar una segunda señal a través del segundo electrodo para cargar o descargar el condensador precargado por medio del nanoporo.

De acuerdo con otro modo de realización, un procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos que usa un chip sensor que incluye un conjunto de celdas puede incluir aplicar una primera señal de CA a un primer grupo de

celdas del conjunto de celdas, y aplicar una segunda señal de CA a un segundo grupo de celdas del conjunto de celdas, en el que la primera señal de CA y la segunda señal de CA tienen diferentes fases. El procedimiento también puede incluir, durante una primera porción de la primera señal de CA, muestrear, usando un convertidor de analógico a digital (ADC), las señales de salida del primer grupo de celdas y no muestrear las señales de salida del segundo grupo de celdas. El procedimiento puede incluir además, durante una segunda porción de la primera señal de CA, muestrear, usando el ADC, las señales de salida del segundo grupo de celdas y no muestrear las señales de salida del primer grupo de celdas.

Estos y otros modos de realización de la invención se describen en detalle a continuación. Por ejemplo, otros modos de realización se refieren a sistemas y dispositivos asociados con los procedimientos descritos en el presente documento.

En otras palabras, la presente invención proporciona un chip sensor para secuenciación de ácidos nucleicos, comprendiendo el chip sensor un primer conjunto de celdas organizadas en N grupos, siendo N un número entero de dos o más, teniendo cada celda un electrodo de celda que se configura para proporcionar una señal de CA a la celda para caracterizar un nucleótido de una molécula de ácido nucleico; y al menos N circuitos, configurado cada circuito de los al menos N circuitos para proporcionar una señal de CA configurable por separado a uno o más electrodos de celda de un grupo respectivo de una o más celdas de los N grupos, en el que los N circuitos se configuran para proporcionar señales de CA con diferentes fases a diferentes grupos de una o más celdas en los N grupos.

Cada celda del primer conjunto de celdas puede incluir un electrodo común configurado para proporcionar una segunda señal a la celda, compartido el electrodo común por dos o más celdas del primer conjunto de celdas. Cada celda del primer conjunto de celdas puede incluir además un nanoporo situado entre el electrodo de celda y el electrodo común, en la que el nanoporo se configura para recibir una marca conectada a un nucleótido y actuar como una resistencia variable entre el electrodo de celda y el electrodo común. Cada celda del primer conjunto de celdas puede incluir además un condensador integrador acoplado al electrodo de celda; y cada circuito de los al menos N circuitos se puede configurar para precargar los condensadores integradores de un grupo respectivo de una o más celdas de los N grupos con la señal de CA. En este caso, los condensadores integradores precargados de un grupo de una o más celdas se pueden configurar para cargarse o descargarse por la segunda señal.

El chip sensor también puede comprender además un circuito de muestreo acoplado al primer conjunto de celdas, en el que los N circuitos se configuran para proporcionar diferentes señales de CA a los N grupos; y el circuito de muestreo se configura para muestrear selectivamente señales de voltaje de uno o más grupos de una o más celdas de los N grupos en base a las señales de CA proporcionadas a los N grupos. Durante un primer período de tiempo, un nivel de voltaje de la señal de CA proporcionada a uno o más electrodos de celda de un primer grupo de una o más celdas de los N grupos puede ser mayor que un nivel de voltaje de la segunda señal proporcionada a los electrodos comunes del primer grupo de una o más celdas; un nivel de voltaje de la señal de CA proporcionada a uno o más electrodos de celda de un segundo grupo de una o más celdas de los N grupos puede ser menor que un nivel de voltaje de la segunda señal proporcionada a los electrodos comunes del segundo grupo de una o más celdas; y el circuito de muestreo se puede configurar para muestrear señales de voltaje del primer grupo de una o más celdas o bien del segundo grupo de una o más celdas, pero no de ambos. Durante un segundo período de tiempo, un nivel de voltaje de la señal de CA proporcionada a uno o más electrodos de celda de un primer grupo de una o más celdas de los N grupos puede ser mayor que un nivel de voltaje de la segunda señal proporcionada a los electrodos comunes del primer grupo de una o más celdas; un nivel de voltaje de la señal de CA proporcionada a uno o más electrodos de celda de un segundo grupo de una o más celdas de los N grupos puede ser mayor que un nivel de voltaje de la segunda señal proporcionada a los electrodos comunes del segundo grupo de una o más celdas; y el circuito de muestreo se puede configurar para realizar uno de: muestrear las señales de voltaje del primer grupo de una o más celdas, pero no del segundo grupo de una o más celdas, a una primera tasa de muestreo; muestrear las señales de voltaje del segundo grupo de una o más celdas, pero no del primer grupo de una o más celdas, a la primera tasa de muestreo; y muestrear las señales de voltaje del primer grupo de una o más celdas a una segunda tasa de muestreo y muestrear las señales de voltaje del segundo grupo de una o más celdas a una tercera tasa de muestreo, en el que las segunda y tercera tasas de muestreo son menores que la primera tasa de muestreo. El circuito de muestreo también puede incluir un convertidor de analógico a digital (ADC); y el circuito de muestreo se puede configurar para cambiar dinámicamente una configuración del nivel de referencia para el ADC en base a las diferentes señales de CA proporcionadas a los N grupos.

La señal de CA del chip sensor puede ser una onda rectangular y puede tener un ciclo de trabajo igual a o menor que un 50 %. La segunda señal puede ser una segunda señal de CA con una frecuencia menor que una frecuencia de la señal de CA o puede ser una señal de CC. Los N circuitos se pueden configurar para proporcionar señales de CA con diferentes fases a diferentes grupos de una o más celdas en los N grupos.

El chip sensor puede comprender además un segundo conjunto de celdas organizadas en N grupos, teniendo cada celda del segundo conjunto de celdas un electrodo de celda que se configura para proporcionar una señal de CA a la celda para caracterizar un nucleótido de una molécula de ácido nucleico, en el que cada circuito de los al menos N circuitos se configura para proporcionar una señal de CA configurable por separado a uno o más electrodos de

celda de un grupo respectivo de los N grupos del primer conjunto de celdas y a uno o más electrodos de celda de un grupo respectivo de los N grupos del segundo conjunto de celdas. Además, el chip sensor puede comprender además un primer circuito de muestreo acoplado al primer conjunto de celdas y configurado para muestrear selectivamente señales de voltaje de uno o más grupos de los N grupos del primer conjunto de celdas; y un segundo circuito de muestreo acoplado al segundo conjunto de celdas y configurado para muestrear selectivamente señales de voltaje de uno o más grupos de los N grupos del segundo conjunto de celdas.

El chip sensor también puede comprender dos o más canales fluídicos, en el que las celdas en diferentes canales fluídicos se organizan en diferentes grupos de los N grupos. Cada circuito de los al menos N circuitos puede incluir un conmutador, estando configurado el conmutador para conectar de forma alterna un electrodo de celda a dos niveles de voltaje; y estando controlado cada conmutador por una señal de control de CA. Cada uno de los N grupos puede incluir al menos una celda.

Cada celda del primer conjunto de celdas puede incluir un conmutador, estando configurado el conmutador para conectar de forma alterna un electrodo de celda a dos niveles de voltaje; estando controlado cada conmutador por una señal de control de CA; en la que cada circuito de los al menos N circuitos incluye uno o más conmutadores de las una o más celdas en el grupo respectivo; y los uno o más conmutadores de las una o más celdas en el grupo respectivo reciben una misma señal de control de CA.

La presente invención también proporciona un chip sensor para secuenciación de ácidos nucleicos que comprende un primer conjunto de celdas organizadas en N grupos, siendo N un número entero de dos o más, teniendo cada celda un electrodo de celda que se configura para proporcionar una señal de CA a la celda para caracterizar un nucleótido de una molécula de ácido nucleico; un convertidor de analógico a digital (ADC) acoplado al primer conjunto de celdas y configurado para convertir las señales de salida del primer conjunto de celdas; y un circuito de control configurado para aplicar una primera señal de CA a un primer grupo de celdas de los N grupos de celdas; aplicar una segunda señal de CA a un segundo grupo de celdas de los N grupos de celdas, en el que la primera señal de CA y la segunda señal de CA tienen diferentes fases; y durante una primera porción de la primera señal de CA, provocar que el ADC convierta las señales de salida del primer grupo de celdas y no convierta las señales de salida del segundo grupo de celdas.

La presente invención también proporciona un procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos que usa un chip sensor que incluye un conjunto de celdas, comprendiendo el procedimiento aplicar una primera señal de CA a un primer grupo de celdas del conjunto de celdas; aplicar una segunda señal de CA a un segundo grupo de celdas del conjunto de celdas, en el que la primera señal de CA y la segunda señal de CA tienen diferentes fases; durante una primera porción de la primera señal de CA, muestrear, usando un convertidor de analógico a digital (ADC), las señales de salida del primer grupo de celdas y no muestrear las señales de salida del segundo grupo de celdas; y durante una segunda porción de la primera señal de CA, muestrear, usando el ADC, las señales de salida del segundo grupo de celdas y no muestrear las señales de salida del primer grupo de celdas.

Aplicar la primera señal de CA al primer grupo de celdas del conjunto de celdas puede comprender aplicar la primera señal de CA a un electrodo de celda de cada celda del primer grupo de celdas; y aplicar la segunda señal de CA al segundo grupo de celdas del conjunto de celdas puede comprender aplicar la segunda señal de CA a un electrodo de celda de cada celda del segundo grupo de celdas.

El procedimiento puede comprender además aplicar una señal común a un electrodo común compartido por el conjunto de celdas, en el que la señal común es una señal de CC o una tercera señal de CA que tiene una frecuencia menor que una frecuencia de la primera señal de CA y una frecuencia de la segunda señal de CA. Además, el procedimiento puede comprender además, durante una tercera porción de la primera señal de CA, muestrear, usando el ADC, señales de salida tanto del segundo grupo de celdas como del primer grupo de celdas. Además, se puede cambiar una configuración del nivel de referencia para el ADC en base a la primera señal de CA y la segunda señal de CA.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista superior de un modo de realización de un chip sensor de nanoporos que tiene una matriz de celdas de nanoporo.

La FIG. 2 ilustra un modo de realización de una celda de nanoporo en un chip sensor de nanoporos que se puede usar para caracterizar un polinucleótido o un polipéptido.

La FIG. 3 ilustra un modo de realización de una celda de nanoporo que realiza la secuenciación de nucleótidos usando una técnica de secuenciación por síntesis basada en nanoporos (Nano-SBS).

La FIG. 4 ilustra un modo de realización de un circuito eléctrico en una celda de nanoporo.

La FIG. 5 muestra puntos de datos de ejemplo captados de una celda de nanoporo durante períodos brillantes y

períodos oscuros de ciclos de CA.

La FIG. 6 es una vista en sección transversal de una matriz de celdas de nanoporo en un chip sensor de nanoporos de ejemplo.

La FIG. 7 es una vista superior de una matriz de celdas de nanoporo de ejemplo que incluye una matriz bidimensional de celdas de nanoporo.

La FIG. 8 es un esquema de una matriz de celdas de nanoporo de ejemplo que incluye una matriz bidimensional de celdas de nanoporo.

La FIG. 9 ilustra muestras de datos de ejemplo captadas de celdas de nanoporo en una columna de una matriz de celdas de nanoporo.

La FIG. 10 es un esquema de una matriz de celdas de nanoporo de ejemplo que incluye una matriz bidimensional de celdas de nanoporo, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 11 ilustra señales de control de ejemplo para una matriz de celdas de nanoporo, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 12 ilustra muestras de datos de ejemplo captadas de celdas de nanoporo en una columna de una matriz de celdas de nanoporo, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 13 muestra señales de control de ejemplo para una matriz de celdas de nanoporo, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 14A muestra niveles de referencia fijos para un ADC en un chip sensor de nanoporos, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 14B ilustra niveles de referencia variables para un ADC en un chip sensor de nanoporos, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 15 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento de ejemplo de secuenciación de ácidos nucleicos usando un sensor que incluye un conjunto de celdas, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación.

La FIG. 16 es un diagrama de bloques de un sistema informático de ejemplo utilizable con un sistema y procedimientos, que es útil para entender la invención.

Definiciones

"*Ácido nucleico*" se puede referir a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bien bicatenaria. El término puede englobar ácidos nucleicos que contienen análogos nucleotídicos conocidos o residuos o enlaces de cadena principal modificados, que son sintéticos, naturales y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de forma similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos pueden incluir, sin limitación, fosforotioatos, fosforamiditas, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metilrribonucleótidos, ácidos peptidonucleicos (PNA). El término ácido nucleico se puede usar de manera intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

El término "*molde*" se puede referir a una molécula de ácido nucleico monocatenaria que se copia en una hebra complementaria de nucleótidos de ADN para la síntesis de ADN. En algunos casos, un molde se puede referir a la secuencia de ADN que se copia durante la síntesis de ARNm.

El término "*cebador*" se puede referir a una secuencia de ácido nucleico corta que proporciona un punto de partida para la síntesis de ADN. Las enzimas que catalizan la síntesis de ADN, tales como ADN polimerasas, pueden añadir nuevos nucleótidos a un cebador para la replicación de ADN.

Como se usa en el presente documento, el término "*columna*" se puede referir, en general, a celdas de nanoporo en una matriz de celdas de nanoporo que comparten un circuito de muestreo y conversión. Las celdas de nanoporo en una columna se pueden fabricar o no físicamente en una columna sobre un chip sensor de nanoporosos.

Como se usa en el presente documento, el término "*período brillante*" se puede referir, en general, al período de tiempo cuando una marca de un nucleótido marcado se fuerza hacia un nanoporo por un campo eléctrico aplicado a través de una señal de CA. El término "*período oscuro*" se puede referir, en general, al período de tiempo cuando una marca de un nucleótido marcado se expulsa del nanoporo por el campo eléctrico aplicado a través de la señal

de CA. Un ciclo de CA puede incluir el período brillante y el período oscuro. En diferentes modos de realización, la polaridad de la señal de voltaje aplicada a una celda de nanoporo para poner la celda de nanoporo en el período brillante (o en el período oscuro) puede ser diferente.

Descripción detallada

Las técnicas divulgadas en el presente documento se refieren a la secuenciación de ácidos nucleicos basada en nanoporos y, más específicamente, a incrementar la tasa de muestreo de datos por un chip sensor de secuenciación basada en nanoporos que incluye un gran número de celdas de nanoporo de secuenciación paralela.

En la secuenciación por síntesis basada en nanoporos (Nano-SBS), en general, se desean tasas de muestreo mayores porque, por ejemplo, una tasa de muestreo mayor permite la observación de acontecimientos que tienen duraciones más cortas, lo que puede incrementar la exactitud para la llamada de bases. Los ejemplos de dichos acontecimientos pueden incluir una marca de nucleótido no unido que entra brevemente al nanoporo, uniéndose brevemente el nucleótido pero sin catalizarse, y catalizándose rápidamente un nucleótido (potencialmente seguido del mismo nucleótido que se cataliza en la siguiente posición). Sin embargo, existe un límite superior para la tasa de muestreo posible debido, por ejemplo, a la velocidad limitada de muestreo y conversión de los convertidores de analógico a digital, y/o al ancho de banda limitado de los buses, dispositivos de almacenamiento de datos o circuitos de procesamiento de datos.

Las señales de CA se pueden usar en Nano-SBS para mejorar la vida útil de un chip sensor de nanoporos que incluye una matriz de celdas de nanoporo. Por ejemplo, se puede aplicar un nivel constante al electrodo de trabajo de cada celda de nanoporo en el chip sensor de nanoporos, y se puede aplicar una señal de CA universal a un contraelectrodo compartido de las celdas de nanoporo. En este ejemplo, cada celda de nanoporo pasa por los ciclos de CA sustancialmente en la misma fase. Cada ciclo de CA puede incluir un período brillante (se puede introducir una marca en un nanoporo para identificar un nucleótido) y un período oscuro, donde el ciclo de trabajo puede ser bajo (es decir, el período oscuro puede ser mucho más largo que el período brillante). Por tanto, todas las celdas de nanoporo del chip sensor de nanoporos estarían en el período brillante o en el período oscuro aproximadamente al mismo tiempo.

Durante el período brillante, un circuito de muestreo y conversión de datos asociado con celdas de nanoporo en una columna puede muestrear y convertir secuencialmente las señales de voltaje de salida de cada celda de nanoporo en la columna, como parte de la identificación de una marca y, en consecuencia, de un nucleótido que se incorpora. La señal de CA atrae (hace pasar) una marca de nucleótido unido hacia el nanoporo en el período brillante y, por tanto, las señales medidas proporcionan información sobre qué marca (y, por tanto, qué nucleótido) está unido actualmente. Durante el período oscuro (cualquier marca de nucleótido se expulsa del nanoporo), la información sobre cualquier marca de nucleótido en el nanoporo no se puede obtener y, por tanto, las señales de voltaje de salida de las celdas tienen poco o ningún uso. Sin embargo, durante el período oscuro, las señales de voltaje de salida de las celdas todavía se pueden muestrear y convertir de todos modos, o el circuito de muestreo y conversión de datos puede estar inactivo. Por tanto, es posible que una porción significativa del ancho de banda del circuito de muestreo y conversión de datos no se utilice para captar datos útiles, al menos durante el período oscuro.

Además, para los chips sensores de nanoporos con una alta densidad de celdas, un único circuito de muestreo y conversión puede dar servicio a múltiples celdas. Por tanto, cada celda se puede muestrear a una tasa mucho menor que la tasa de muestreo completa del circuito de muestreo y conversión.

Las técnicas divulgadas en el presente documento abordan los problemas anteriores aplicando señales de CA con diferentes fases a diferentes celdas de nanoporo en una columna, de modo que, cuando algunas celdas de nanoporo en la columna están en el período oscuro, algunas otras celdas de nanoporo en la misma columna están en el período brillante. Por ejemplo, las celdas de nanoporo de una columna se pueden organizar en dos o más grupos. Se puede aplicar un nivel de voltaje constante a los contraelectrodos de todas las celdas de nanoporo, y la fase de una señal de CA aplicada a los electrodos de trabajo de las celdas de nanoporo en cada grupo de celdas de nanoporo se puede retrasar en un valor diferente.

De esta manera, en cualquier momento dado, el circuito de muestreo y conversión de datos puede muestrear y convertir las señales de voltaje de salida de la porción de las celdas de nanoporo en la columna que están en el período brillante, mientras que el período oscuro se muestrea mínimamente, por ejemplo, solo para propósitos de normalización. Como tal, el muestreo y la conversión de datos se pueden realizar a una tasa mayor para cada celda de nanoporo durante el período brillante, puesto que el circuito da servicio a menos celdas en un momento dado. Además, debido a que el período oscuro solo se muestrea mínimamente, todos o casi todos los datos captados serían útiles, a diferencia del caso donde el período oscuro se muestrea a una tasa innecesariamente alta. De esta manera, los modos de realización pueden reducir el número de celdas a las que se da servicio por el circuito de muestreo y conversión en cualquier período de tiempo y, por tanto, incrementar la tasa de muestreo por celda incluso sin usar un circuito de muestreo y conversión de datos más rápido.

I. Chip de secuenciación basada en nanoporos

La FIG. 1 es una vista superior de un modo de realización de un chip sensor de nanoporos 100 que tiene una matriz 140 de celdas de nanoporo 150. Cada celda de nanoporo 150 incluye un circuito de control integrado en un sustrato de silicio del chip sensor de nanoporos 100. En algunos modos de realización, se pueden incluir paredes laterales 136 en la matriz 140 para separar grupos de celdas de nanoporo 150 de modo que cada grupo puede recibir una muestra diferente para su caracterización. Cada celda de nanoporo se puede usar para secuenciar un ácido nucleico. En algunos modos de realización, el chip sensor de nanoporos 100 puede incluir una placa de cubierta 130. En algunos modos de realización, el chip sensor de nanoporos 100 también puede incluir una pluralidad de clavijas 110 para interactuar con otros circuitos, tales como un procesador de ordenador.

En algunos modos de realización, el chip sensor de nanoporos 100 puede incluir múltiples chips en un mismo paquete, tales como, por ejemplo, un módulo multichip (MCM) o un sistema en paquete (SiP). Los chips pueden incluir, por ejemplo, una memoria, un procesador, una matriz de puertas programables en campo (FPGA), un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC), convertidores de datos, una interfaz de E/S de alta velocidad, etc.

En algunos modos de realización, el chip sensor de nanoporos 100 se puede acoplar a (por ejemplo, unir a) una estación de trabajo de nanochip 120, que puede incluir diversos componentes para llevar a cabo (por ejemplo, llevar a cabo automáticamente) diversos modos de realización de los procedimientos divulgados en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, mecanismos de suministro de analito, tales como pipetas para suministrar suspensión de lípidos u otra suspensión de estructura de membrana, solución de analito y/u otros líquidos, suspensiones o sólidos, brazos robóticos, procesador de ordenador y/o memoria. Se puede detectar una pluralidad de polinucleótidos en la matriz 140 de celdas de nanoporo 150. En algunos modos de realización, cada celda de nanoporo 150 puede ser abordable individualmente.

II. Celda de secuenciación con nanoporos

Las celdas de nanoporo 150 en el chip sensor de nanoporos 100 se pueden implementar de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, en algunos modos de realización, se pueden fijar marcas de diferentes tamaños y/o estructuras químicas a diferentes nucleótidos en una molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar. En algunos modos de realización, se puede sintetizar una hebra complementaria a un molde de la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar hibridando nucleótidos marcados con polímeros de forma diferente con el molde. En algunas implementaciones, la molécula de ácido nucleico y las marcas fijadas se pueden mover ambas a través del nanoporo, y una corriente de iones que pasa a través del nanoporo puede indicar el nucleótido que está en el nanoporo debido al tamaño y/o estructura particulares de la marca fijada al nucleótido. En algunas implementaciones, solo las marcas se pueden mover hacia el nanoporo. También puede haber muchas maneras diferentes de detectar las diferentes marcas en los nanoporos.

A. Estructura de celda de secuenciación con nanoporos

La FIG. 2 ilustra un modo de realización de una celda de nanoporo 200 de ejemplo en un chip sensor de nanoporos, tal como la celda de nanoporo 150 en el chip sensor de nanoporos 100 de la FIG. 1, que se puede usar para caracterizar un polinucleótido o un polipéptido. La celda de nanoporo 200 puede incluir un pocillo 205 formado por capas dieléctricas 201 y 204; una membrana, tal como una bicapa lipídica 214 formada sobre el pocillo 205; y una cámara de muestra 215 sobre la bicapa lipídica 214 y separada del pocillo 205 por la bicapa lipídica 214. El pocillo 205 puede contener un volumen de electrólito 206, y la cámara de muestra 215 puede contener electrólito a granel 208 que contiene un nanoporo, por ejemplo, un complejo molecular transmembranario de nanoporo de proteína soluble (PNTMC), y el analito de interés (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar).

La celda de nanoporo 200 puede incluir un electrodo de trabajo 202 en el fondo del pocillo 205 y un contraelectrodo 210 dispuesto en la cámara de muestra 215. Una fuente de señales 228 puede aplicar una señal de voltaje entre el electrodo de trabajo 202 y el contraelectrodo 210. Se puede insertar un único nanoporo (por ejemplo, un PNTMC) en la bicapa lipídica 214 por un procedimiento de electroporación provocado por la señal de voltaje, formando, de este modo, un nanoporo 216 en la bicapa lipídica 214. Las membranas individuales (por ejemplo, bicapas lipídicas 214 u otras estructuras de membrana) en la matriz no pueden estar conectadas entre sí ni química ni eléctricamente. Por tanto, cada celda de nanoporo en la matriz puede ser un aparato de secuenciación independiente, que produce datos únicos para la molécula de polímero individual asociada con el nanoporo que actúa sobre el analito de interés y modula la corriente iónica a través de la bicapa lipídica de otro modo impermeable.

Como se muestra en la FIG. 2, se puede formar la celda de nanoporo 200 sobre un sustrato 230, tal como un sustrato de silicio. Se puede formar la capa dieléctrica 201 sobre el sustrato 230. El material dieléctrico usado para formar la capa dieléctrica 201 puede incluir, por ejemplo, vidrio, óxidos, nitruros y similares. Se puede formar un circuito eléctrico 222 para controlar la estimulación eléctrica y para procesar la señal detectada desde la celda de

nanoporo 200 sobre el sustrato 230 y/o dentro de la capa dieléctrica 201. Por ejemplo, se puede formar una pluralidad de capas metálicas estampadas (por ejemplo, de metal 1 a metal 6) en la capa dieléctrica 201, y se puede fabricar una pluralidad de dispositivos activos (por ejemplo, transistores) sobre el sustrato 230. En algunos modos de realización, la fuente de señales 228 se incluye como parte del circuito eléctrico 222. El circuito eléctrico 222 puede incluir, por ejemplo, amplificadores, integradores, convertidores de analógico a digital, filtros de ruido, lógica de control de retroalimentación y/u diversos otros componentes. Se puede acoplar además el circuito eléctrico 222 a un procesador 224 que se acopla a una memoria 226, donde el procesador 224 puede analizar los datos de secuenciación para determinar secuencias de las moléculas de polímero que se han secuenciado en la matriz.

Se puede formar el electrodo de trabajo 202 sobre la capa dieléctrica 201 y puede formar al menos una parte del fondo del pocillo 205. En algunos modos de realización, el electrodo de trabajo 202 es un electrodo de metal. Para la conducción no faradaica, el electrodo de trabajo 202 se puede hacer de metales u otros materiales que son resistentes a la corrosión y la oxidación, tales como, por ejemplo, platino, oro, nitruro de titanio y grafito. Por ejemplo, el electrodo de trabajo 202 puede ser un electrodo de platino con platino electrodepositado. En otro ejemplo, el electrodo de trabajo 202 puede ser un electrodo de trabajo de nitruro de titanio (TiN). El electrodo de trabajo 202 puede ser poroso, incrementando, de este modo, su área de superficie y una capacidad resultante asociada con el electrodo de trabajo 202. Debido a que el electrodo de trabajo de una celda de nanoporo puede ser independiente del electrodo de trabajo de otra celda de nanoporo, en la presente divulgación el electrodo de trabajo se puede denominar electrodo de celda.

Se puede formar la capa dieléctrica 204 encima de la capa dieléctrica 201. La capa dieléctrica 204 forma las paredes que rodean el pocillo 205. El material dieléctrico usado para formar la capa dieléctrica 204 puede incluir, por ejemplo, vidrio, óxido, mononitruro de silicio (SiN), poliimida u otro material aislante hidrófobo adecuado. La superficie superior de la capa dieléctrica 204 se puede silanizar. La silanización puede formar una capa hidrófoba 220 encima de la superficie superior de la capa dieléctrica 204. En algunos modos de realización, la capa hidrófoba 220 tiene un espesor de aproximadamente 1,5 nanómetros (nm).

El pocillo 205 formado por las paredes de capa dieléctrica 204 incluye un volumen de electrólito 206 encima del electrodo de trabajo 202. El volumen de electrólito 206 se puede tamponar y puede incluir uno o más de los siguientes: cloruro de litio (LiCl), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), glutamato de litio, glutamato de sodio, glutamato de potasio, acetato de litio, acetato de sodio, acetato de potasio, cloruro de calcio ($CaCl_2$), cloruro de estroncio ($SrCl_2$), cloruro de manganeso ($MnCl_2$) y cloruro de magnesio ($MgCl_2$). En algunos modos de realización, el volumen de electrólito 206 tiene un espesor de aproximadamente tres micrómetros (µm).

Como también se muestra en la FIG. 2, se puede formar una membrana en la parte superior de la capa dieléctrica 204 y que abarca todo el pocillo 205. En algunos modos de realización, la membrana puede incluir una monocapa lipídica 218 formada en la parte superior de la capa hidrófoba 220. A medida que la membrana alcanza la abertura del pocillo 205, la monocapa lipídica 208 se puede convertir en la bicapa lipídica 214 que abarca toda la abertura del pocillo 205. La bicapa lipídica puede comprender o consistir en fosfolípido, por ejemplo, seleccionado de difitanoil-fosfatidilcolina (DPhPC), 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-di-O-fitanil-sn-glicero-3-fosfocolina (DoPhPC), palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), éster dioleoil-fosfatidil-metílico (DOPME), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, esfingomielina, 1,2-di-O-fitanil-sn-glicerol; 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-350]; 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-550]; 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-750]; 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-1000]; 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]; 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-lactosil; gangliósido GM1, lisofosfatidilcolina (LPC) o cualquier combinación de los mismos.

Como se muestra, la bicapa lipídica 214 se incluye en un único nanoporo 216, por ejemplo, formado por un único PNTMC. Como se describe anteriormente, se puede formar el nanoporo 216 insertando un único PNTMC en la bicapa lipídica 214 por electroporación. El nanoporo 216 puede ser lo suficientemente grande como para permitir el paso de al menos una porción del analito de interés y/o iones pequeños (por ejemplo, Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-) entre los dos lados de la bicapa lipídica 214.

La cámara de muestra 215 está sobre la bicapa lipídica 214 y puede contener una solución del analito de interés para su caracterización. La solución puede ser una solución acuosa que contiene electrólito a granel 208 y tamponada a una concentración de iones óptima y mantenida a un pH óptimo para mantener abierto el nanoporo 216. El nanoporo 216 cruza la bicapa lipídica 214 y proporciona la única ruta para el flujo iónico desde el electrólito a granel 208 al electrodo de trabajo 202. Además de los nanoporos (por ejemplo, los PNTMC) y el analito de interés, el electrólito a granel 208 puede incluir además uno o más de los siguientes: cloruro de litio (LiCl), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), glutamato de litio, glutamato de sodio, glutamato de potasio, acetato de litio, acetato de sodio, acetato de potasio, cloruro de calcio ($CaCl_2$), cloruro de estroncio ($SrCl_2$), cloruro de

manganeso ($MnCl_2$) y cloruro de magnesio ($MgCl_2$).

El contraelectrodo (CE) 210 puede ser un sensor de potencial electroquímico. En algunos modos de realización, el contraelectrodo 210 se puede compartir entre una pluralidad de celdas de nanoporo y, por lo tanto, se puede denominar electrodo común. En algunos casos, el potencial común y el electrodo común pueden ser comunes a todas las celdas de nanoporo, o al menos a todas las celdas de nanoporo dentro de una agrupación particular. El electrodo común se puede configurar para aplicar un potencial común al electrólito a granel 208 en contacto con el nanoporo 216. El contraelectrodo 210 y el electrodo de trabajo 202 se pueden acoplar a la fuente de señales 228 para proporcionar un estímulo eléctrico (por ejemplo, polarización de voltaje) a través de la bicapa lipídica 214, y se pueden usar para detectar características eléctricas de la bicapa lipídica 214 (por ejemplo, resistencia, capacidad y flujo de corriente iónica). En algunos modos de realización, la celda de nanoporo 200 también puede incluir un electrodo de referencia 212.

En algunos modos de realización, se pueden realizar diversas comprobaciones durante la creación de la celda de nanoporo como parte de la calibración. Una vez que se crea una celda de nanoporo, se pueden realizar otras etapas de calibración, por ejemplo, para identificar celdas de nanoporo que están funcionando como se desea (por ejemplo, un nanoporo en la celda). Dichas comprobaciones de calibración pueden incluir comprobaciones físicas, calibración de voltaje, calibración de canal abierto e identificación de celdas con un único nanoporo.

B. Señales de detección de celda de secuenciación con nanoporos

Las celdas de nanoporo en el chip sensor de nanoporos, tales como las celdas de nanoporo 150 en el chip sensor de nanoporos 100, pueden posibilitar la secuenciación en paralelo usando una técnica de secuenciación por síntesis basada en nanoporos (nano-SBS) de una única molécula.

La FIG. 3 ilustra un modo de realización de una celda de nanoporo 300 que realiza la secuenciación de nucleótidos usando la técnica nano-SBS. En la técnica nano-SBS, un molde 332 que se va a secuenciar (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico u otro analito de interés) y un cebador se pueden introducir en el electrólito a granel 308 en la cámara de muestra de la celda de nanoporo 300. Como ejemplo, el molde 332 puede ser circular o lineal. Un cebador de ácido nucleico se puede hibridar con una porción del molde 332 a la que se pueden añadir cuatro nucleótidos 338 marcados con polímero de forma diferente.

En algunos modos de realización, una enzima (por ejemplo, una polimerasa 334, tal como una ADN polimerasa) se puede asociar con el nanoporo 316 para su uso en la síntesis de una hebra complementaria al molde 332. Por ejemplo, la polimerasa 334 se puede fijar covalentemente al nanoporo 316. La polimerasa 334 puede catalizar la incorporación de los nucleótidos 338 al cebador usando una molécula de ácido nucleico monocatenario como molde. Los nucleótidos 338 pueden comprender especies de marca ("marcas"), siendo el nucleótido uno de cuatro tipos diferentes: A, T, G o C. Cuando un nucleótido marcado se compleja correctamente con la polimerasa 334, la marca se puede atraer (cargar) hacia el nanoporo por una fuerza eléctrica, tal como una fuerza generada en presencia de un campo eléctrico generado por un voltaje aplicado a través de la bicapa lipídica 314 y/o el nanoporo 316. La cola de la marca se puede situar en el cilindro del nanoporo 316. La marca contenida en el cilindro del nanoporo 316 puede generar una señal de bloqueo iónico única 340 debido a la estructura química y/o tamaño distintivos de la marca, identificando electrónicamente, de este modo, la base añadida a la que se fija la marca.

Como se usa en el presente documento, una marca "cargada" o "de paso" puede ser una que se sitúa en y/o permanece en o cerca del nanoporo durante una cantidad de tiempo apreciable, por ejemplo, de 0,1 milisegundos (ms) a 10000 ms. En algunos casos, una marca se carga en el nanoporo antes de liberarse del nucleótido. En algunos casos, la probabilidad de que una marca cargada pase a través del (y/o se detecte por el) nanoporo después de liberarse tras un acontecimiento de incorporación de nucleótido es adecuadamente alta, por ejemplo, de un 90 % a un 99 %.

En algunos modos de realización, antes de que la polimerasa 334 se conecte al nanoporo 316, la conductancia del nanoporo 316 puede ser alta, tal como, por ejemplo, aproximadamente 300 *picosiemens* (300 pS). A medida que la marca se carga en el nanoporo, se genera una señal de conductancia única (por ejemplo, la señal 340) debido a la estructura química y/o el tamaño distintivos de la marca. Por ejemplo, la conductancia del nanoporo puede ser de aproximadamente 60 pS, 80 pS, 100 pS o 120 pS, correspondiente cada una a uno de los cuatro tipos de nucleótidos marcados. A continuación, la polimerasa puede experimentar una reacción de isomerización y una de transfosforilación para incorporar el nucleótido a la molécula de ácido nucleico en crecimiento y liberar la molécula de marca.

En algunos casos, algunos de los nucleótidos marcados pueden no coincidir (bases complementarias) con una posición actual de la molécula de ácido nucleico (molde). Los nucleótidos marcados que no están emparejados por base con la molécula de ácido nucleico también pueden pasar a través del nanoporo. Estos nucleótidos no emparejados se pueden rechazar por la polimerasa dentro de una escala de tiempo que es más corta que la escala de tiempo durante la que los nucleótidos emparejados correctamente permanecen asociados con la polimerasa. Las marcas unidas a nucleótidos no emparejados pueden pasar a través del nanoporo rápidamente y detectarse

durante un corto período de tiempo (por ejemplo, menos de 10 ms), mientras que las marcas unidas a nucleótidos emparejados se pueden cargar en el nanoporo y detectarse durante un período de tiempo largo (por ejemplo, al menos 10 ms). Por lo tanto, los nucleótidos no emparejados se pueden identificar por un procesador posterior en base al menos en parte en el tiempo durante el que se detecta el nucleótido en el nanoporo.

Se puede medir una conductancia (o equivalentemente la resistencia) del nanoporo que incluye la marca cargada (de paso) por medio de una corriente que pasa a través del nanoporo, proporcionando, de este modo, una identificación de la especie de marca y, por tanto, del nucleótido en la posición actual. En algunos modos de realización, se puede aplicar una señal de corriente continua (CC) a la celda de nanoporo (por ejemplo, de modo que la dirección en la que se mueve la marca a través del nanoporo no se invierta). Sin embargo, hacer funcionar un sensor de nanoporo durante períodos de tiempo largos usando una corriente continua puede cambiar la composición del electrodo, desequilibrar las concentraciones de iones a través del nanoporo y tener otros efectos indeseables que pueden afectar la vida útil de la celda de nanoporo. Aplicar una forma de onda de corriente alterna (CA) puede reducir la electromigración para evitar estos efectos indeseables y tiene determinadas ventajas como se describe a continuación. Los procedimientos de secuenciación de ácidos nucleicos descritos en el presente documento que utilizan nucleótidos marcados son completamente compatibles con los voltajes de CA aplicados y, por lo tanto, se puede usar una forma de onda de CA para lograr estas ventajas.

La capacidad de recargar el electrodo durante el ciclo de detección de CA puede ser ventajosa cuando se usan electrodos de sacrificio, electrodos que cambian el carácter molecular en las reacciones que transportan corriente (por ejemplo, electrodos que comprenden plata) o electrodos que cambian el carácter molecular en las reacciones que transportan corriente. Un electrodo se puede agotar durante un ciclo de detección cuando se usa una señal de corriente continua. La recarga puede evitar que el electrodo alcance un límite de agotamiento, tal como que se agote completamente, lo que puede ser un problema cuando los electrodos son pequeños (por ejemplo, cuando los electrodos son lo suficientemente pequeños como para proporcionar una matriz de electrodos que tiene al menos 500 electrodos por milímetro cuadrado). La vida útil del electrodo en algunos casos varía con, y al menos depende en parte de, la anchura del electrodo.

Son conocidas en la técnica condiciones adecuadas para medir corrientes iónicas que pasan a través de los nanoporos y en el presente documento se proporcionan ejemplos. La medición se puede llevan a cabo con un voltaje aplicado a través de la membrana y el poro. En algunos modos de realización, el voltaje usado puede variar de -400 mV a +400 mV. El voltaje usado está preferentemente en un intervalo que tiene un límite inferior seleccionado de -400 mV, -300 mV, -200 mV, -150 mV, -100 mV, -50 mV, -20 mV y 0 mV y un límite superior seleccionado independientemente de +10 mV, +20 mV, +50 mV, +100 mV, +150 mV, +200 mV, +300 mV y +400 mV. El voltaje usado puede estar, más preferentemente en el intervalo de 100 mV a 240 mV y, lo más preferentemente, en el intervalo de 160 mV a 240 mV. Es posible incrementar la discriminación entre diferentes nucleótidos por un nanoporo usando un potencial aplicado incrementado. La secuenciación de ácidos nucleicos usando formas de onda de CA y nucleótidos marcados se describe en la publicación de patente de EE. UU. n.º US 2014/0134616 titulada "Nucleic Acid Sequencing Using Tags", presentada el 6 de noviembre de 2013. Además de los nucleótidos marcados descritos en el documento US 2014/0134616, la secuenciación se puede realizar usando análogos de nucleótido que carecen de un resto glucídico o acíclico, por ejemplo, nucleósidos trifosfato de (S)-glicerol (gNTP) de las cinco nucleobases comunes: adenina, citosina, guanina, uracilo y timina (Horhota *et al.* Organic Letters, 8:5345-5347 [2006]).

C. Circuito eléctrico de la celda de secuenciación con nanoporos

La FIG. 4 ilustra un modo de realización de un circuito eléctrico 400 (que puede incluir porciones del circuito eléctrico 222 en la FIG. 2) en una celda de nanoporo, tal como la celda de nanoporo 200. Como se describe anteriormente, en algunos modos de realización, el circuito eléctrico 400 incluye un contraelectrodo 210 que se puede compartir entre una pluralidad de celdas de nanoporo o todas las celdas de nanoporo en un chip sensor de nanoporos y, por lo tanto, también se puede denominar electrodo común. El electrodo común se puede configurar para aplicar un potencial común al electrólito a granel (por ejemplo, electrólito a granel 208) en contacto con la bicapa lipídica (por ejemplo, bicapa lipídica 214) en las celdas de nanoporo conectándose a una fuente de voltaje V_{LiQ} 420. En algunos modos de realización, se puede utilizar un modo no faradaico de CA para modular el voltaje V_{LiQ} con una señal de CA (por ejemplo, una onda cuadrada) y aplicarla al electrólito a granel en contacto con la bicapa lipídica en la celda de nanoporo. En algunos modos de realización, V_{LiQ} es una onda cuadrada con una magnitud de ±200-250 mV y una frecuencia entre, por ejemplo, 25 y 400 Hz. El electrólito a granel entre el contraelectrodo 210 y la bicapa lipídica (por ejemplo, la bicapa lipídica 214) se puede modelar por un condensador grande (no mostrado), tal como, por ejemplo, de 100 µF o más grande.

La FIG. 4 también muestra un modelo eléctrico 422 que representa las propiedades eléctricas de un electrodo de trabajo (por ejemplo, el electrodo de trabajo 202) y la bicapa lipídica (por ejemplo, la bicapa lipídica 214). El modelo eléctrico 422 incluye un condensador 426 (C_{Bicapa}) que modela una capacidad asociada a la bicapa lipídica y una resistencia 428 (R_{poro}) que modela una resistencia variable asociada con el nanoporo, que puede cambiar en base a la presencia de una marca particular en el nanoporo. El modelo eléctrico 422 también incluye un condensador 424 que tiene una capacidad de doble capa ($C_{Doble\ capa}$) y que representa las propiedades eléctricas del electrodo

de trabajo 202 y del pocillo 205. El electrodo de trabajo 202 se puede configurar para aplicar un potencial distintivo independiente de los electrodos de trabajo en otras celdas de nanoporo.

El dispositivo de paso 406 es un conmutador que se puede usar para conectar o desconectar la bicapa lipídica y el electrodo de trabajo del circuito eléctrico 400. El dispositivo de paso 406 se puede controlar por un bit de memoria para posibilitar o imposibilitar que se aplique un estímulo de voltaje a través de la bicapa lipídica en la celda de nanoporo. Antes de que se depositen los lípidos para formar la bicapa lipídica, la impedancia entre los dos electrodos puede ser muy baja porque el pocillo de la celda de nanoporo no está sellado y, por lo tanto, el dispositivo de paso 406 se puede mantener abierto para evitar una condición de cortocircuito. El dispositivo de paso 406 se puede cerrar después de que se ha depositado el disolvente lipídico en la celda de nanoporo para sellar el pocillo de la celda de nanoporo.

El circuito 400 puede incluir además un condensador integrador en el chip 408 (n_{con}). El condensador integrador 408 se puede precargar usando una señal de reinicio 403 para cerrar el conmutador 401, de modo que el condensador integrador 408 se conecte a una fuente de voltaje V_{PRE} 405. En algunos modos de realización, la fuente de voltaje V_{PRE} 405 proporciona un voltaje positivo constante con una magnitud de, por ejemplo, 900 mV. Cuando el conmutador 401 está cerrado, el condensador integrador 408 se puede precargar al nivel de voltaje positivo de la fuente de voltaje V_{PRE} 405.

Después de que el condensador integrador 408 se precarga, la señal de reinicio 403 se puede usar para abrir el conmutador 401 de modo que el condensador integrador 408 se desconecte de la fuente de voltaje V_{PRE} 405. En este punto, dependiendo del nivel de la fuente de voltaje $V_{LÍQ}$, el potencial del contraelectrodo 210 puede estar en un nivel mayor que el potencial del electrodo de trabajo 202 (y del condensador integrador 408) o viceversa. Por ejemplo, durante una fase positiva de una onda cuadrada desde la fuente de voltaje $V_{LÍQ}$ (por ejemplo, el período brillante u oscuro del ciclo de señales de fuente de voltaje de CA), el potencial del contraelectrodo 210 está en un nivel mayor que el potencial del electrodo de trabajo 202. Durante una fase negativa de la onda cuadrada de la fuente de voltaje $V_{LÍQ}$ (por ejemplo, el período oscuro o brillante del ciclo de señales de fuente de voltaje de CA), el potencial del contraelectrodo 210 está en un nivel menor que el potencial del electrodo de trabajo 202. Por tanto, en algunos modos de realización, el condensador integrador 408 se puede cargar además durante el período brillante a partir del nivel de voltaje precargado de la fuente de voltaje V_{PRE} 405 a un nivel mayor, y descargarse durante el período oscuro a un nivel menor, debido a la diferencia de potencial entre el contraelectrodo 210 y el electrodo de trabajo 202. En otros modos de realización, la carga y la descarga se pueden producir en períodos oscuros y períodos brillantes, respectivamente.

El condensador integrador 408 se puede cargar o descargar durante un período de tiempo fijo, dependiendo de la tasa de muestreo de un convertidor de analógico a digital (ADC) 410, que puede ser mayor que 1 kHz, 5 kHz, 10 kHz, 100 kHz o más. Por ejemplo, con una tasa de muestreo de 1 kHz, el condensador integrador 408 se puede cargar/descargar durante un período de aproximadamente 1 ms y, a continuación, el nivel de voltaje se puede muestrear y convertir por el ADC 410 al final del período de integración. Un nivel de voltaje particular correspondería a una especie de marca particular en el nanoporo y, por tanto, correspondería al nucleótido en una posición actual en el molde.

Después de muestrearse por el ADC 410, el condensador integrador 408 se puede precargar de nuevo usando la señal de reinicio 403 para cerrar el conmutador 401, de modo que el condensador integrador 408 se conecta a la fuente de voltaje V_{PRE} 405 de nuevo. Las etapas de precarga del condensador integrador 408, espera de un período de tiempo fijo para que el condensador integrador 408 se cargue o descargue, y muestreo y conversión del nivel de voltaje del condensador integrador por el ADC 410 se pueden repetir en ciclos en todo el procedimiento de secuenciación.

Un procesador digital 430 puede procesar los datos de salida de ADC, por ejemplo, para normalización, almacenamiento intermedio de datos, filtrado de datos, compresión de datos, reducción de datos, extracción de acontecimientos o ensamblaje de datos de salida de ADC de la matriz de celdas de nanoporo en diversas tramas de datos. En algunos modos de realización, el procesador digital 430 puede realizar un procesamiento posterior adicional, tal como la determinación de base. El procesador digital 430 se puede implementar como equipo físico (por ejemplo, en una GPU, FPGA, ASIC, etc.) o como una combinación de equipo físico y programa informático.

En consecuencia, la señal de voltaje aplicada a través del nanoporo se puede usar para detectar estados particulares del nanoporo. Uno de los posibles estados del nanoporo es un estado de canal abierto cuando un polifosfato fijado a la marca está ausente del cilindro del nanoporo. Otros cuatro estados posibles del nanoporo corresponden cada uno a un estado donde uno de los cuatro tipos diferentes de nucleótidos de polifosfato fijados a la marca (A, T, G o C) se mantiene en el cilindro del nanoporo. Aún otro posible estado del nanoporo es cuando la bicapa lipídica se rompe.

Cuando se mide el nivel de voltaje en el condensador integrador 408 después de un período de tiempo fijo, los diferentes estados de un nanoporo pueden dar como resultado mediciones de diferentes niveles de voltaje. Esto se debe a que la tasa de caída de voltaje (disminución por descarga o incremento por carga) en el condensador

integrador 408 (es decir, la inclinación de la pendiente de un gráfico de voltaje en el condensador integrador 408 frente al tiempo) depende de la resistencia de nanoporo (por ejemplo, la resistencia de la resistencia R_{PORO} 428). Más en particular, como la resistencia asociada con el nanoporo en diferentes estados es diferente debido a las estructuras químicas distintivas de las moléculas (de las marcas), se pueden observar diferentes tasas correspondientes de caída de voltaje y se pueden usar para identificar los diferentes estados del nanoporo. La curva de caída de voltaje puede ser una curva exponencial con una constante de tiempo de RC $\tau = RC$, donde R es la resistencia asociada con el nanoporo (es decir, R_{PORO} 428) y C es la capacidad asociada con la membrana (es decir, el condensador 426 (C_{Bicapa})) en paralelo con R. Una constante de tiempo de la celda de nanoporo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 200-500 ms. La curva de caída puede no ajustarse exactamente a una curva exponencial debido a la implementación detallada de la bicapa, pero la curva de caída puede ser similar a una curva exponencial y es repetitiva, permitiendo, por tanto, la detección de marcas.

En algunos modos de realización, la resistencia asociada con el nanoporo en un estado de canal abierto puede estar en el intervalo de 100 MOhm a 20 GOhm. En algunos modos de realización, la resistencia asociada con el nanoporo en un estado donde una marca está en el interior del cilindro del nanoporo puede estar dentro del intervalo de 200 MOhm a 40 GOhm. En otros modos de realización, se puede omitir el condensador integrador 408, ya que el voltaje que se conduce al ADC 410 variará todavía debido a la caída de voltaje en el modelo eléctrico 422.

La tasa de la caída del voltaje en el condensador integrador 408 se puede determinar de diferentes maneras. Como se expone anteriormente, la tasa de la caída de voltaje se puede determinar midiendo una caída de voltaje durante un intervalo de tiempo fijo. Por ejemplo, se puede medir el voltaje en el condensador integrador 408, en primer lugar, por el ADC 410 en el tiempo t1 y, a continuación, se mide el voltaje de nuevo por el ADC 410 en el tiempo t2. La diferencia de voltaje es mayor cuando la pendiente del voltaje en la curva del condensador integrador 408 frente al tiempo es más pronunciada, y la diferencia de voltaje es más pequeña cuando la pendiente de la curva de voltaje es menos pronunciada. Por tanto, se puede usar la diferencia de voltaje como una métrica para determinar la tasa de la caída del voltaje en el condensador integrador 408 y, por tanto, el estado de la celda de nanoporo.

En otros modos de realización, la tasa de la caída de voltaje se puede determinar midiendo una duración de tiempo que se requiere para una cantidad seleccionada de caída de voltaje. Por ejemplo, se puede medir el tiempo requerido para que el voltaje descienda o se incremente desde un primer nivel de voltaje V1 hasta un segundo nivel de voltaje V2. El tiempo requerido es menor cuando la pendiente de la curva de voltaje frente a tiempo es más pronunciada, y el tiempo requerido es mayor cuando la pendiente de la curva de voltaje frente a tiempo es menos pronunciada. Por tanto, se puede usar el tiempo medido requerido como una métrica para determinar la tasa de la caída del voltaje en el condensador integrador n_{con} 408 y, por tanto, el estado de la celda de nanoporo. Un experto en la técnica apreciará los diversos circuitos que se pueden usar para medir la resistencia del nanoporo, por ejemplo, incluyendo las técnicas de medición de corriente.

En algunos modos de realización, el circuito eléctrico 400 puede no incluir un dispositivo de paso (por ejemplo, el dispositivo de paso 406) y un condensador adicional (por ejemplo, el condensador integrador 408 (n_{con})) que se fabrican en el chip, facilitando de este modo la reducción en el tamaño del chip de secuenciación basada en nanoporos. Debido a la naturaleza delgada de la membrana (bicapa lipídica), la capacidad asociada con la membrana (por ejemplo, el condensador 426 (C_{Bicapa})) por sí sola puede ser suficiente para crear la constante de tiempo de RC requerida sin necesidad de la capacidad en el chip adicional. Por lo tanto, el condensador 426 se puede usar como condensador integrador y se puede precargar por la señal de voltaje V_{PRE} y posteriormente descargarse o cargarse por la señal de voltaje $V_{LÍQ}$. La eliminación del condensador adicional y del dispositivo de paso que de otro modo se fabrican en el chip del circuito eléctrico puede reducir significativamente la superficie ocupada de una única celda de nanoporo en el chip de secuenciación de nanoporos, facilitando de este modo el escalamiento del chip de secuenciación de nanoporos para incluir cada vez más celdas (por ejemplo, tener millones de celdas en un chip de secuenciación de nanoporos).

D. Muestreo de datos en celdas de nanoporo

Para realizar la secuenciación de un ácido nucleico, se puede muestrear y convertir el nivel de voltaje del condensador integrador (por ejemplo, el condensador integrador 408 (n_{con}) o el condensador 426 (C_{Bicapa})) por el ADC (por ejemplo, el ADC 410) mientras se añade un nucleótido marcado al ácido nucleico. La marca del nucleótido se puede empujar hacia el cilindro del nanoporo por el campo eléctrico a través del nanoporo que se aplica a través del contraelectrodo y el electrodo de trabajo, por ejemplo, cuando el voltaje aplicado es de modo que $V_{LÍQ}$ es menor que V_{PRE}.

1. Paso

Un acontecimiento de paso es cuando un nucleótido marcado se fija al molde (por ejemplo, un fragmento de ácido nucleico) y la marca se mueve dentro y fuera del cilindro del nanoporo. Esto puede suceder múltiples veces durante un acontecimiento de paso. Cuando la marca está en el cilindro del nanoporo, la resistencia del nanoporo puede ser mayor y una corriente menor puede fluir a través del nanoporo.

Durante la secuenciación, es posible que una marca no esté en el nanoporo en algunos ciclos de CA (denominados estado de canal abierto), donde la corriente es la más alta debido a la menor resistencia del nanoporo. Cuando una marca se atrae hacia el cilindro del nanoporo, el nanoporo está en modo brillante. Cuando la marca se expulsa del cilindro del nanoporo, el nanoporo está en modo oscuro.

2. Período brillante y oscuro

Durante un ciclo de CA, se puede muestrear el voltaje en el condensador integrador múltiples veces por el ADC. Por ejemplo, en un modo de realización, se aplica una señal de voltaje de CA a través del sistema a, por ejemplo, aproximadamente 100 Hz, y una tasa de adquisición del ADC puede ser de aproximadamente 2000 Hz por celda. Por tanto, pueden existir aproximadamente 20 puntos de datos (mediciones de voltaje) captados por ciclo de CA (ciclo de una forma de onda de CA). Los puntos de datos correspondientes a un ciclo de la forma de onda de CA se pueden denominar conjunto. En un conjunto de puntos de datos para un ciclo de CA, puede existir un subconjunto captado cuando, por ejemplo, $V_{LÍQ}$ es menor que V_{PRE}, que puede corresponder a un modo (período) brillante donde la marca se fuerza hacia el cilindro del nanoporo. Otro subconjunto puede corresponder a un modo (período) oscuro cuando la marca se expulsa del cilindro del nanoporo por el campo eléctrico aplicado cuando, por ejemplo, $V_{LÍQ}$ es mayor que V_{PRE}.

3. Voltajes medidos

Para cada punto de datos, cuando se abre el conmutador 401, el voltaje en el condensador integrador (por ejemplo, el condensador integrador 408 (n_{con}) o el condensador 426 (C_{Bicapa})) cambiará de forma decreciente como resultado de la carga/descarga por $V_{LÍQ}$, por ejemplo, como un incremento de V_{PRE} a $V_{LÍQ}$ cuando $V_{LÍQ}$ es mayor que V_{PRE} o una disminución de V_{PRE} a $V_{LÍQ}$ cuando $V_{LÍQ}$ es menor que V_{PRE}. Los valores de voltaje final pueden diferir de $V_{LÍQ}$ a medida que se carga el electrodo de trabajo. La tasa de cambio del nivel de voltaje en el condensador integrador se puede regir por el valor de la resistencia de la bicapa, que puede incluir el nanoporo, que a su vez puede incluir una molécula (por ejemplo, una marca de un nucleótido marcado) en el nanoporo. El nivel de voltaje se puede medir en un tiempo predeterminado después de que se abre el conmutador 401.

El conmutador 401 puede funcionar a la tasa de adquisición de datos. El conmutador 401 se puede cerrar durante un período de tiempo relativamente corto entre dos adquisiciones de datos, típicamente justo después de una medición realizada por el ADC. El conmutador permite recopilar múltiples puntos de datos para cada ciclo. Si el conmutador 401 permanece abierto, el nivel de voltaje en el condensador integrador y, por tanto, el valor de salida del ADC, caería completamente y permanecería allí. Dichas mediciones múltiples pueden permitir una mayor resolución con un ADC fijo (por ejemplo, de 8 bits a 14 bits debido al mayor número de mediciones, que se pueden promediar). Las mediciones múltiples también pueden proporcionar información cinética sobre la molécula de paso por el nanoporo. La información de tiempo puede permitir la determinación de cuánto tiempo tarda en pasar. Esto también se puede usar para ayudar a determinar si se secuencian múltiples nucleótidos que se añaden a la hebra de ácido nucleico.

La FIG. 5 muestra puntos de datos de ejemplo captados de una celda de nanoporo durante períodos brillantes y períodos oscuros de ciclos de CA. En la FIG. 5, el cambio en los puntos de datos se exagera con propósitos ilustrativos. El voltaje (V_{PRE}) aplicado al electrodo de trabajo o al condensador integrador está en un nivel constante, tal como, por ejemplo, 900 mV. Una señal de voltaje 510 ($V_{LÍQ}$) aplicada al contraelectrodo de las celdas de nanoporo es una señal de CA mostrada como una onda rectangular, donde el ciclo de trabajo puede ser cualquier valor adecuado, tal como menor que o igual a un 50 %, por ejemplo, aproximadamente un 40 %.

Durante un período brillante 520, la señal de voltaje 510 ($V_{LÍQ}$) aplicada al contraelectrodo es menor que el voltaje V_{PRE} aplicado al electrodo de trabajo, de modo que una marca se puede forzar hacia el cilindro del nanoporo por el campo eléctrico provocado por los diferentes niveles de voltaje aplicados en el electrodo de trabajo y el contraelectrodo (por ejemplo, debido a la carga en la marca y/o el flujo de los iones). Cuando se abre el conmutador 401, el voltaje en un nodo antes del ADC (por ejemplo, en un condensador integrador) disminuirá. Después de captar un punto de datos de voltaje (por ejemplo, después de un período de tiempo especificado), se puede cerrar el conmutador 401 y el voltaje en el nodo de medición se incrementará de vuelta a V_{PRE} de nuevo. El procedimiento se puede repetir para medir múltiples puntos de datos de voltaje. De esta manera, se pueden captar múltiples puntos de datos durante el período brillante.

Como se muestra en la FIG. 5, un primer punto de datos 522 (también denominado primer punto delta (FPD)) en el período brillante después de un cambio en el signo de la señal $V_{LÍQ}$ puede ser menor que los puntos de datos 524 posteriores. Esto se puede deber a que no hay ninguna marca en el nanoporo (canal abierto) y, por tanto, tiene una baja resistencia y una alta tasa de descarga. En algunos casos, el primer punto de datos 522 puede exceder el nivel de $V_{LÍQ}$ como se muestra en la FIG. 5. Esto se puede provocar por la capacidad de la bicapa que acopla la señal al condensador en el chip. Los puntos de datos 524 se pueden captar después de que se ha producido un acontecimiento de paso, es decir, se fuerza una marca hacia el cilindro del nanoporo, donde la resistencia del nanoporo y, por tanto, la tasa de descarga del condensador integrador depende del tipo de marca particular que se

fuerza hacia el cilindro del nanoporo. Los puntos de datos 524 pueden disminuir ligeramente para cada medición debido a la carga acumulada en $C_{Doble\ capa}$ 424, como se menciona a continuación.

Durante un período oscuro 530, la señal de voltaje 510 ($V_{LÍQ}$) aplicada al contraelectrodo es mayor que el voltaje (V_{PRE}) aplicado al electrodo de trabajo, de modo que cualquier marca se expulsaría fuera del cilindro del nanoporo. Cuando se abre el conmutador 401, el voltaje en el nodo de medición se incrementa porque el nivel de voltaje de la señal de voltaje 510 ($V_{LÍQ}$) es mayor que V_{PRE}. Después de captar un punto de datos de voltaje (por ejemplo, después de un período de tiempo especificado), el conmutador 401 se puede cerrar y el voltaje en el nodo de medición disminuirá de vuelta a V_{PRE} de nuevo. El procedimiento se puede repetir para medir múltiples puntos de datos de voltaje. Por tanto, se pueden captar múltiples puntos de datos durante el período oscuro, incluyendo un primer punto delta 532 y puntos de datos 534 posteriores. Como se describe anteriormente, durante el período oscuro, cualquier marca de nucleótido se expulsa del nanoporo y, por tanto, se obtiene una información mínima sobre cualquier marca de nucleótido, además de para su uso en la normalización. Por lo tanto, las señales de voltaje de salida de las celdas durante el período oscuro pueden tener poco o ningún uso.

La FIG. 5 también muestra que durante el período brillante 540, aunque la señal de voltaje 510 ($V_{LÍQ}$) aplicada al contraelectrodo es menor que el voltaje (V_{PRE}) aplicado al electrodo de trabajo, no se produce ningún acontecimiento de paso (canal abierto). Por tanto, la resistencia del nanoporo es baja y la tasa de descarga del condensador integrador es alta. Como resultado, los puntos de datos captados, incluyendo un primer punto de datos 542 y puntos de datos 544 posteriores, muestran niveles de voltaje bajo.

Se podría esperar que el voltaje medido durante un período brillante u oscuro sea aproximadamente el mismo para cada medición de una resistencia constante del nanoporo (por ejemplo, realizada durante un modo brillante de un ciclo de CA dado mientras una marca está en el nanoporo), pero este puede no ser el caso cuando la carga se acumula en el condensador de doble capa 424 ($C_{Doble\ capa}$). Esta acumulación de carga puede provocar que la constante de tiempo de la celda de nanoporo se alargue. Como resultado, el nivel de voltaje se puede desplazar, provocando de este modo que el valor medido disminuya para cada punto de datos en un ciclo. Por tanto, dentro de un ciclo, los puntos de datos pueden cambiar un poco de un punto de datos a otro, como se muestra en la FIG. 5.

4. Determinación de bases

Para cada celda de nanoporo utilizable del chip sensor de nanoporos, se puede ejecutar un modo de producción para secuenciar ácidos nucleicos. Los datos de salida de ADC captados durante la secuenciación se pueden normalizar para proporcionar una mayor exactitud. La normalización puede tener en cuenta efectos de desviación, tales como la conformación del ciclo y el desplazamiento del valor de referencia. Después de la normalización, los modos de realización pueden determinar agrupamientos de voltajes para los canales de paso, donde cada agrupamiento corresponde a una especie de marca diferente y, por tanto, a un nucleótido diferente. Los agrupamientos se pueden usar para determinar las probabilidades de que un voltaje dado corresponda a un nucleótido dado. Como otro ejemplo, los agrupamientos se pueden usar para determinar voltajes de corte para discriminar entre diferentes nucleótidos (bases).

Se pueden encontrar otros detalles con respecto a la operación de secuenciación en, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 2016/0178577 titulada "Nanopore-Based Sequencing With Varying Voltage Stimulus", la publicación de patente de EE. UU. n.º 2016/0178554 titulada "Nanopore-Based Sequencing With Varying Voltage Stimulus", la solicitud de patente de EE. UU. n.º 15/085.700 titulada "Non-Destructive Bilayer Monitoring Using Measurement Of Bilayer Response To Electrical Stimulus" y la solicitud de patente de EE. UU. n.º 15/085.713 titulada "Electrical Enhancement Of Bilayer Formation".

III. Matriz de celdas de nanoporo

Cuando las celdas de nanoporo de secuenciación se disponen en el chip sensor de nanoporos, se pueden secuenciar muchas moléculas de ácido nucleico en paralelo. Cada celda puede tener algunos circuitos especializados (por ejemplo, un condensador integrador), pero también puede compartir algunos circuitos, por ejemplo, un ADC, una fuente de señales, un electrodo o un circuito de control.

La FIG. 6 es una vista en sección transversal de una matriz 600 de celdas de nanoporo en un chip sensor de nanoporos de ejemplo, tal como la matriz de celdas de nanoporo 150 en el chip sensor de nanoporos 140 vista a lo largo de la línea A-A mostrada en la FIG. 1. La FIG. 6 muestra una pluralidad de celdas de nanoporo en una fila o una columna de una matriz 600 de celdas de nanoporo. Como se describe anteriormente con respecto a la FIG. 2, cada celda de nanoporos incluye un circuito eléctrico 622 integrado en el sustrato de silicio 630 y/o la capa dieléctrica 601 del chip sensor de nanoporos. Cada celda de nanoporo incluye un pocillo 605 respectivo formado por capas dieléctricas 601 y 604 y un electrodo de trabajo 602 en el fondo del pocillo 605. El pocillo 605 puede contener el volumen del electrólito 606. Se puede formar una bicapa lipídica 614 sobre la capa dieléctrica 604 y cubrir cada pocillo 605. La bicapa lipídica 614 incluye un nanoporo 616 en la parte superior de cada pocillo 605. La cámara de muestra 615 en la parte superior de la bicapa lipídica 614 se puede configurar para contener el electrólito a granel 608, que puede incluir las moléculas que se van a analizar y nucleótidos marcados con polímero

o cebadores, como se describe anteriormente. Una molécula 670 que se va a analizar se puede unir al nanoporo 616, por ejemplo, por una interacción entre una polimerasa y la molécula 670). En algunos modos de realización, las paredes laterales 636 (tales como las paredes laterales 136 mostradas en la FIG. 1) se pueden incluir en la matriz 600 para separar grupos de celdas de nanoporo de modo que cada grupo pueda recibir una muestra diferente para su caracterización. En algunos modos de realización, el chip sensor de nanoporos puede incluir la placa de cubierta 630 que encierra la cámara de muestra 615.

Los contraelectrodos 610 de diferentes celdas de nanoporo se pueden disponer en la cámara de muestra 615 y se pueden conectar a la fuente de voltaje 628 para aplicar un $V_{LÍQ}$ común a las celdas de nanoporo. Los contraelectrodos 610 para diferentes celdas de nanoporo se pueden conectar físicamente entre sí para formar un electrodo común. Los electrodos de trabajo 602 de diferentes celdas de nanoporo se pueden conectar a una fuente de voltaje común, o se pueden conectar independientemente a diferentes fuentes de voltaje. En algunos modos de realización, los circuitos eléctricos 622 de diferentes celdas de nanoporo se pueden conectar a un bus 660, y el nivel de voltaje en los condensadores integradores de las diferentes celdas de nanoporo se puede leer secuencialmente a través del bus 660 seleccionando secuencialmente las diferentes celdas de nanoporo como se describe en detalle a continuación.

La FIG. 7 es una vista superior de una matriz de celdas de nanoporo 700 de ejemplo que incluye una matriz bidimensional de celdas de nanoporo 708. La matriz de celdas de nanoporo 700 puede incluir miles o incluso millones de celdas de nanoporo. Por ejemplo, en un modo de realización, la matriz de celdas de nanoporo 700 puede incluir 512x512 celdas de nanoporo dispuestas en 512 líneas y 512 columnas. En algunos modos de realización, la matriz de celdas de nanoporo 700 se puede agrupar en diferentes baterías 706, donde cada batería puede incluir un subconjunto de las celdas de nanoporo en la matriz de celdas de nanoporo 700. En algunos modos de realización, las celdas de nanoporo en cada columna de la matriz de celdas de nanoporo 700 se pueden agrupar entre sí, y los niveles de voltaje en los condensadores integradores de las celdas de nanoporo en cada columna se pueden muestrear y convertir por un ADC 712. Las celdas de nanoporo en una columna pueden compartir el mismo ADC para reducir el área global y el consumo de energía del chip sensor de nanoporos.

Se pueden usar accionadores de fila y el circuito de precarga 718 para precargar selectivamente las celdas de nanoporo en una o más filas (por ejemplo, cerrando el conmutador 401 de la FIG. 4 para conectar las celdas de nanoporo en una o más filas a V_{PRE} usando líneas de selección de fila (o líneas de palabra) 714). Se pueden usar también accionadores de fila y el circuito de precarga 718 para seleccionar secuencialmente cada fila usando líneas de selección de fila (es decir, líneas de palabra) 714. Los condensadores integradores de las celdas de nanoporo en la fila seleccionada se pueden conectar a las líneas de columna 716 correspondientes (por ejemplo, a través de un conmutador (no mostrado) entre el condensador integrador en el chip 408 (n_{con}) y el ADC 410, o a través del dispositivo de paso 406 si el condensador integrador en el chip 408 (n_{con}) no se usa). Las señales de voltaje de las celdas de nanoporo en la fila seleccionada se pueden procesar opcionalmente (por ejemplo, detectarse y amplificarse) por los amplificadores de columna 720 correspondientes, y convertirse en salidas digitales por los ADC 712 correspondientes. En algunos modos de realización, se podrían atender múltiples columnas por el mismo amplificador de columna y ADC.

La FIG. 8 es un esquema de una matriz de celdas de nanoporo 800 de ejemplo que incluye una matriz bidimensional de celdas de nanoporo 802. La matriz de celdas de nanoporo 800 puede incluir todas las celdas de nanoporo de un chip sensor de nanoporos, o puede incluir solo un subconjunto (por ejemplo, una batería) de las celdas de nanoporo de un chip sensor de nanoporos. El electrodo de trabajo de cada celda de nanoporo 802 se puede conectar a una fuente de voltaje (por ejemplo, V_{PRE} de la FIG. 4) (no mostrado), y el contraelectrodo de cada celda de nanoporo 802 se puede conectar a una señal $V_{LÍQ\ COMÚN}$. La matriz de celdas de nanoporo 800 incluye una pluralidad de líneas de columna 820, cada línea de columna 820 acoplada a celdas de nanoporo 802 en una misma columna y acoplada a un ADC 840. La matriz de celdas de nanoporo 800 incluye M filas de celdas de nanoporo 802, donde cada una de las M filas se puede seleccionar por las líneas de selección de fila 810-0 a 810-M-1.

Durante el proceso de secuenciación, un condensador integrador de cada celda de nanoporo 802 se puede precargar en primer lugar por una fuente de voltaje V_{PRE} aplicada al electrodo de trabajo (por ejemplo, a través del conmutador 401 como se muestra en la FIG. 4), y se puede aplicar la señal $V_{LÍQ}$ común a los contraelectrodos de las celdas de nanoporo 802, como se describe anteriormente. Después de que los condensadores integradores en las celdas de nanoporo 802 se han cargado/descargado, cada una de las M filas se puede seleccionar secuencialmente para conectar los condensadores integradores de las celdas de nanoporo en una fila a las líneas de columna correspondientes y los ADC correspondientes. Los condensadores integradores se pueden amortiguar para evitar el acoplamiento a través de condensadores parásitos. Por tanto, el ADC 840, para una columna, puede muestrear y convertir secuencialmente los niveles de voltaje de los condensadores integradores de las celdas de nanoporo en la columna.

De esta manera, se puede captar un conjunto de muestras de datos de las celdas de nanoporo en una columna de una matriz de celdas de nanoporo después de cada operación de precarga y carga/descarga. Cuando se realizan múltiples operaciones de precarga y carga/descarga en los períodos brillantes y oscuros de un ciclo de CA, se

pueden captar múltiples conjuntos de muestras de datos, donde cada conjunto de muestras de datos incluye una muestra de datos de cada una de las celdas de nanoporo en la columna.

La FIG. 9 ilustra muestras de datos de ejemplo captadas de celdas de nanoporo en una columna de una matriz de celdas de nanoporo, tal como la matriz de celdas de nanoporo 800, durante un ciclo de CA. En la FIG. 9, el eje horizontal representa el tiempo durante el proceso de secuenciación. La FIG. 9 muestra que, durante el tiempo T_B de un período brillante de un ciclo de CA, se puede captar un total de K muestras de cada celda de nanoporo por un ADC que atiende la columna.

Como se describe anteriormente con respecto a la FIG. 8, una columna de la matriz de celdas de nanoporo puede incluir M celdas de nanoporo, cada una en una fila diferente. El ADC puede captar una muestra de datos para la celda de nanoporo en la fila 0, una muestra de datos para la celda de nanoporo en la fila 1, ..., y una muestra de datos para la celda de nanoporo en la fila M-1. Cada captación de ADC se puede controlar por una señal de reloj que es mucho más rápida que la señal de CA aplicada a los electrodos de las celdas de nanoporo. Después de que se ha muestreado una vez cada celda de nanoporo en la columna, la celda de nanoporo en la columna se puede precargar de nuevo por la fuente de voltaje V_{PRE}, y cargarse/descargarse por la señal $V_{LÍQ\ COMÚN}$. Posteriormente, se puede captar una segunda muestra de datos de cada una de las M celdas de nanoporo en la columna secuencialmente o en una tubería. El proceso de secuenciación se puede repetir para captar K muestras de cada una de las M celdas de nanoporo en la columna durante el período brillante. Como resultado, se puede captar un número total de MxK muestras de las M celdas de nanoporo en cada columna durante el tiempo T_B del período brillante. Por tanto, la tasa de muestreo del ADC puede ser al menos MxK/T_B para captar MxK muestras durante el tiempo T_B del período brillante. Las muestras de datos se pueden captar de forma similar durante el período oscuro.

IV. Matrices de celdas de nanoporo en fase

Como se analiza anteriormente, existe un límite superior para la tasa de muestreo posible debido, por ejemplo, a la velocidad limitada de muestreo y conversión de los convertidores de analógico a digital, y/o al ancho de banda limitado de los buses, dispositivos de almacenamiento de datos o circuitos de procesamiento de datos. Cuando todas las celdas de nanoporo en una columna se controlan por una señal $V_{LÍQ}$ común, casi todos los datos útiles se captan durante el período brillante común, mientras que durante el período oscuro, es posible que se capten pocos o ningún dato útil. Por tanto, es posible que una porción significativa del ancho de banda de un circuito de muestreo y conversión de datos no se utilice para captar datos útiles, al menos durante el período oscuro.

Las técnicas divulgadas en el presente documento abordan los problemas anteriores e incrementan la tasa de muestreo eficaz por celda del circuito de muestreo y conversión aplicando señales de CA con diferentes fases a diferentes celdas de nanoporo en una columna. Como resultado, cuando algunas celdas de nanoporo están en el período oscuro, otras celdas de nanoporo están en el período brillante y se están muestreando por el circuito de muestreo y conversión compartido. Por ejemplo, en algunos modos de realización, las celdas de nanoporo en una columna se pueden organizar en dos o más grupos. Un $V_{LÍQ}$ común se puede aplicar a los contraelectrodos de todas las celdas de nanoporo, y la fase de una señal V_{PRE} de CA aplicada a los electrodos de trabajo de las celdas de nanoporo en cada grupo de celdas de nanoporo se puede retrasar en un valor diferente. De esta manera, en cualquier momento dado, el circuito de muestreo y conversión de datos puede muestrear y convertir las señales de voltaje de salida de la porción de las celdas de nanoporo en una columna que están en el período brillante, muestreándose mínimamente el período oscuro, por ejemplo, solo para propósitos de normalización. Como tal, el muestreo y la conversión de datos se pueden realizar a una tasa mayor para cada celda de nanoporo en el período brillante. Además, debido a que el período oscuro solo se muestrea mínimamente, todos o casi todos los datos captados serían útiles, a diferencia del caso donde el período oscuro se muestrea a una tasa innecesariamente alta.

A. Arquitectura

La FIG. 10 es un esquema de una matriz de celdas de nanoporo 1000 de ejemplo que incluye una matriz bidimensional de celdas de nanoporo 1002, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación. De forma similar a la matriz de celdas de nanoporo 800 de la FIG. 8, la matriz de celdas de nanoporo 1000 puede incluir todas las celdas de nanoporo de un chip sensor de nanoporos, o puede incluir solo un subconjunto de las celdas de nanoporo de un chip sensor de nanoporos. La matriz de celdas de nanoporo 1000 incluye una pluralidad de líneas de columna 1020, cada línea de columna 1020 acoplada a celdas de nanoporo 1002 en una misma columna y acoplada a un ADC 1040. La matriz de celdas de nanoporo 1000 incluye M filas de celdas de nanoporo 1002, donde cada una de las M filas se puede seleccionar por una línea de selección de fila 1010. Las celdas de nanoporo 1002 en la matriz de celdas de nanoporo 1000 se pueden organizar en N grupos, donde N puede ser cualquier número entre 2 y el número total de celdas de nanoporo en la columna. En un modo de realización, la matriz de celdas de nanoporo 1000 se puede organizar de modo que cada grupo de los N grupos puede incluir las celdas de nanoporo en M/N filas. En otros modos de realización, las celdas de nanoporo 1002 en la matriz de celdas de nanoporo 1000 se pueden organizar en N grupos de una forma diferente. Por ejemplo, algunos grupos pueden tener más celdas de nanoporo que otros grupos. En algunos modos de realización, las celdas de nanoporo en cada dos filas pueden estar en un mismo grupo. En algunos modos de realización, las celdas de nanoporo en

pares alternos de filas pueden estar en un mismo grupo. En algunos modos de realización, las celdas de nanoporo en un grupo pueden estar en una misma región. En algunos modos de realización, las celdas de nanoporo en un grupo pueden no estar en una misma región y pueden estar separadas por celdas de nanoporo en otros grupos.

El contraelectrodo de cada celda de nanoporo 1002 en la matriz de celdas de nanoporo 1000 se puede conectar a una señal $V_{LÍQ}$ común (no mostrado), que puede ser un nivel de voltaje constante. Los electrodos de trabajo de las celdas de nanoporo 1002 en cada grupo de los N grupos se pueden conectar a una señal V_{PRE} COMÚN (1030), donde las señales V_{PRE} para los N grupos (es decir, V_{PRE} 1, V_{PRE} 2, ..., V_{PRE} N) se pueden aplicar independientemente a los N grupos y pueden estar en diferentes fases entre sí. Por ejemplo, las señales V_{PRE} para los N grupos pueden provenir de una misma fuente de señales pero se pueden retrasar de forma diferente por líneas o puertas de retraso. El retraso permite que el muestreo sea principalmente durante el período brillante, como se ilustra en la FIG. 11 a continuación. De esta manera, se puede lograr un control con una mayor granularidad recibiendo más grupos de celdas de nanoporo diferentes señales V_{PRE}. Debido a que la agrupación se realiza eléctricamente aplicando una misma señal V_{PRE} a las celdas de nanoporo en un grupo, la agrupación puede ser escalable y dinámicamente configurable cuando los electrodos de trabajo de las celdas de nanoporo son abordables independientemente a un nivel de subgrupo o a un nivel de celda.

En algunas implementaciones, cada celda de nanoporo puede incluir un conmutador. El conmutador se puede conectar al conmutador 401 de la FIG. 4, por ejemplo, anterior al conmutador 401 o en paralelo con el conmutador 401, pero con una señal de control coordinada. El conmutador puede conectar selectivamente el electrodo de trabajo de la celda de nanoporo (y la señal de voltaje V_{PRE} 405) a un nivel de alto voltaje o un nivel de bajo voltaje. Por ejemplo, el conmutador se puede controlar por una señal de control de CA, tal como una señal de onda cuadrada o una de onda rectangular, de modo que el electrodo de trabajo se puede conectar al nivel de alto voltaje durante una porción de un ciclo de la señal de control de CA, y se puede conectar al nivel de bajo voltaje durante otra porción del ciclo. En algunos modos de realización, el conmutador se puede implementar usando dos conmutadores controlados por señales de control inversas, donde un conmutador se puede configurar para conectar el electrodo de trabajo al nivel de alto voltaje y el otro conmutador se puede configurar para conectar el electrodo de trabajo al nivel de bajo voltaje. La señal de control de CA puede ser una señal digital, tal como una señal de reloj digital. El nivel de alto voltaje puede ser mayor que la señal $V_{LÍQ}$ COMÚN, y el nivel de bajo voltaje puede ser menor que la señal $V_{LÍQ}$ COMÚN. COMO tal, se puede aplicar eficazmente una señal V_{PRE} de CA a la celda de nanoporo.

Se pueden aplicar diferentes señales V_{PRE} a diferentes celdas de nanoporo aplicando diferentes señales de control de CA digitales (por ejemplo, con diferentes retrasos de fase) a las celdas de nanoporo. Algunas celdas de nanoporo pueden recibir señales de control de CA digitales con la misma fase para formar un grupo de los N grupos de celdas de nanoporo. De esta manera, un grupo puede incluir una o más celdas de nanoporo, y la agrupación de las celdas de nanoporo puede ser más flexible y dinámica. Por ejemplo, la agrupación se puede cambiar dinámicamente modificando las señales de control de CA digitales aplicadas a las celdas de nanoporo, y las celdas de nanoporo que no están en una misma vecindad pueden formar un grupo.

En algunas implementaciones, el chip sensor de nanoporos puede incluir dos o más canales fluídicos diferentes encima de las celdas de nanoporo del chip sensor de nanoporos. Las celdas de nanoporo en el chip sensor de nanoporos se pueden agrupar en base a los canales fluídicos en los que están. Por ejemplo, las celdas de nanoporo en diferentes canales fluídicos se pueden asignar a diferentes grupos. En algunas implementaciones, se pueden agrupar las celdas de nanoporo en dos o más canales fluídicos. A continuación, se puede usar una señal $V_{LÍQ}$ de CA diferente para accionar los contraelectrodos de las celdas de nanoporo en un grupo diferente. Por ejemplo, las señales de CA para accionar los contraelectrodos de las celdas de nanoporo en diferentes grupos pueden tener diferentes fases o retrasos. Como resultado de las diferentes fases de las señales $V_{LÍQ}$, las celdas de nanoporo en diferentes grupos pueden estar en el período brillante en diferentes momentos y, por tanto, las salidas de las celdas de nanoporo en diferentes grupos se pueden muestrear en diferentes momentos por un circuito de muestreo compartido.

B. Señales de CA de diferentes grupos de celdas que tienen diferentes fases

La FIG. 11 ilustra señales (V_{PRE}) de CA de ejemplo para una matriz de celdas de nanoporo, tal como la matriz de celdas de nanoporo 1000, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación. Las celdas de nanoporo en la matriz de celdas de nanoporo 1000 que tiene M filas se pueden organizar en N grupos. La FIG. 11 incluye una pluralidad de gráficos, mostrando cada gráfico la señal de CA aplicada a un grupo de celdas de los N grupos y los puntos de muestra correspondientes. El eje horizontal de la FIG. 11 representa el tiempo durante el proceso de secuenciación.

Como se muestra en la FIG. 11, el contraelectrodo de cada celda de nanoporo en la matriz de celdas de nanoporo 1000 se puede conectar a una señal $V_{LÍQ}$ COMÚN, que puede ser un nivel de voltaje constante. Los electrodos de trabajo de las celdas de nanoporo en cada grupo de los N grupos se pueden conectar a una señal V_{PRE}, donde las señales V_{PRE} para los N grupos (es decir, V_{PRE} 1, V_{PRE} 2, ..., V_{PRE} N) pueden estar en diferentes fases entre sí.

En algunos modos de realización, las señales V_{PRE} para los N grupos se pueden retrasar cada una de forma incremental con respecto a las otras por un período de tiempo aproximadamente igual al período brillante. En el ejemplo mostrado en la FIG. 11, las N señales V_{PRE} son señales de CA rectangulares que alternan entre un nivel de alto voltaje y un nivel de bajo voltaje. Las señales V_{PRE} se retrasan entre sí de modo que, cuando las celdas de nanoporo en un grupo están en el período brillante (por ejemplo, cuando $V_{LÍQ}$ es menor que V_{PRE}), las celdas de nanoporo en otros grupos están en el período oscuro.

Por ejemplo, para las celdas de nanoporo en el grupo 1, durante el período brillante, la señal V_{PRE} 1 puede estar en el nivel de alto voltaje que puede ser mayor que el $V_{LÍQ}$ CONSTANTE, y el condensador integrador en cada celda de nanoporo en el grupo 1 que se controla por V_{PRE} 1 se puede precargar en primer lugar al nivel de alto voltaje de V_{PRE} 1. A continuación, se puede desconectar el condensador integrador DE V_{PRE} 1, y descargarse por la señal $V_{LÍQ}$ de bajo nivel a través del nanoporo. La tasa de descarga depende de la resistencia del nanoporo, que puede variar cuando se fuerzan marcas de diferentes estructuras y tamaños hacia el cilindro del nanoporo como se describe anteriormente. El nivel de voltaje del condensador integrador se puede medir por el circuito de muestreo y conversión (por ejemplo, un ADC) después de que el condensador integrador se ha descargado durante un período de tiempo seleccionado. Se pueden captar una o más muestras de una celda de nanoporo de esta forma durante el período brillante.

Cuando las celdas de nanoporo en el grupo 1 controladas por V_{PRE} 1 están en un período brillante de anchura T_B, las celdas de nanoporo en los grupos 2-N controladas por las señales V_{PRE} 2 a V_{PRE} N, respectivamente, pueden estar en un período oscuro. Durante este período de tiempo T_B, se pueden atender M/N, en lugar de M, celdas de nanoporo en una columna por un ADC. Por tanto, para captar K muestras para cada celda de nanoporo durante el período de tiempo T_B, se puede usar un ADC con una tasa de muestreo de (MxK/T_B)/N. En otras palabras, un ADC con una tasa de muestreo de MxK/T_B puede captar KxN (en lugar de K) muestras para cada celda de nanoporo durante el período de tiempo T_B. En consecuencia, cada celda de nanoporo se puede muestrear a una tasa más rápida (por ejemplo, N veces más rápido) y, por tanto, puede detectar acontecimientos que tienen duraciones más cortas.

Después de que la señal V_{PRE} 1 alterna al nivel de bajo voltaje, las celdas de nanoporo en el grupo 1 pueden entrar al período oscuro. Durante el período oscuro, la señal V_{PRE} 1 puede estar en el nivel de bajo voltaje que puede ser menor que el nivel de $V_{LÍQ}$ constante, y las marcas asociadas con los nucleótidos se pueden expulsar de los nanoporos. En diversos modos de realización, no se puede captar ninguna muestra de datos durante el período oscuro o se pueden captar una o más muestras de datos al final (o al comienzo) del período oscuro en cada ciclo de CA, por ejemplo, para propósitos de normalización. Para limitar además el muestreo en un período oscuro, solo se pueden muestrear algunos períodos oscuros, por ejemplo, cada *n*ésimo período oscuro, tal como cada 8.º período oscuro. Para captar una muestra de datos en el período oscuro, el condensador integrador en cada celda de nanoporos en el grupo 1 que se controla por V_{PRE} 1 en primer lugar se puede precargar al nivel de bajo voltaje de V_{PRE} 1. A continuación, se puede desconectar el condensador integrador de V_{PRE} 1, y cargarse por la señal $V_{LÍQ}$ a través del nanoporo. La tasa de carga depende de la resistencia del nanoporo como se describe anteriormente.

Después de que la señal V_{PRE} 1 alterna al nivel de bajo voltaje, la señal V_{PRE} 2 puede alternar del nivel de bajo voltaje al nivel de alto voltaje de modo que las celdas de nanoporo en el grupo 2 que se controlan por la señal V_{PRE} 2 pueden entrar al período brillante, y las muestras de datos de las celdas de nanoporo en el grupo 2 se pueden captar por el circuito de muestreo y conversión compartido. Como se describe anteriormente, se pueden captar múltiples muestras de datos para cada celda de nanoporo en el grupo 2 durante el período brillante, y se pueden captar una o más muestras de datos de cada celda de nanoporo en el grupo 2 al final de un período oscuro durante uno o más ciclos de CA para propósitos de normalización.

Las celdas de nanoporo en cada uno de los grupos 3 a N pueden entrar al período brillante secuencialmente, y se pueden captar múltiples muestras de datos de cada una de las celdas de nanoporo en cada grupo por el circuito de muestreo y conversión compartido de la forma descrita anteriormente. Después de que las celdas de nanoporo del grupo N entran al período oscuro desde el período brillante, las celdas de nanoporo del grupo 1 pueden entrar de nuevo al período brillante en un nuevo ciclo de CA para el muestreo de datos de secuenciación.

La FIG. 12 ilustra muestras de datos de ejemplo captadas de celdas de nanoporo en una columna de una matriz de celdas de nanoporo, tal como la matriz de celdas de nanoporo 1000, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación. El eje horizontal de la FIG. 12 representa el tiempo durante el proceso de secuenciación. Los cuadros grises en el diagrama indican acontecimientos de selección de fila. La columna de la matriz de celdas de nanoporo incluye M celdas de nanoporo, cada una en una fila diferente. Las M celdas de nanoporo se organizan en N grupos diferentes, con M/N celdas de nanoporo en cada grupo. Cuando las celdas de nanoporo en el grupo 1 (celdas de nanoporo en las filas 0 a M/N-1) sometidas a V_{PRE} 1 están en el período brillante T_B, las celdas de nanoporo en los grupos 2 a N controladas por las señales V_{PRE} 2 a V_{PRE} N, respectivamente, pueden estar en el período oscuro. Por lo tanto, durante el período brillante T_B, solo se pueden captar las salidas de las celdas de nanoporo en la fila 0 a M/N-1 por el ADC que atiende la columna.

Cada una de las celdas de nanoporo en el grupo 1 se puede precargar al nivel alto de señal V_{PRE} 1, y descargarse

por la señal $V_{LÍQ}$ a través del nanoporo. Después de un tiempo de descarga seleccionado, el ADC puede captar una muestra de datos para la celda de nanoporo en la fila 0, una muestra de datos para la celda de nanoporo en la fila 1, ..., y una muestra de datos para la celda de nanoporo en la fila M/N-1. Después de que cada celda en la columna que pertenece al grupo 1 se ha muestreado una vez, cada una de las celdas de nanoporo en el grupo 1 se puede precargar de nuevo al nivel alto de señal V_{PRE} 1, y descargarse por la señal $V_{LÍQ}$ a través del nanoporo. Después del tiempo de descarga seleccionado, el ADC puede captar una segunda muestra de datos para la celda de nanoporo en la fila 0, una segunda muestra de datos para la celda de nanoporo en la fila 1, ..., y una segunda muestra de datos para la celda de nanoporo en la fila M/N-1. El proceso de secuenciación se puede repetir para captar múltiples muestras de cada una de las M/N celdas de nanoporo en el grupo 1 durante el período brillante. Por tanto, para un ADC con una tasa de muestreo de MxK/T_B, se puede captar un número total de NxK muestras de cada una de las M/N celdas en el grupo 1 durante el período brillante T_B, en comparación con K muestras captadas de cada celda de nanoporo durante el período brillante T_B ilustrado en la FIG. 9. Por tanto, en comparación con las celdas de nanoporo en la matriz de celdas de nanoporo 800, cada celda de nanoporo en la matriz de celdas de nanoporo 1000 se puede medir N veces más rápido sin usar un circuito de muestreo y conversión más rápido y, por tanto, se pueden detectar acontecimientos que tienen duraciones más cortas.

De forma similar, cuando las celdas de nanoporo en el grupo 2 (o cualquiera de los grupos 3 a N) están en el período brillante y las celdas de nanoporo de otros grupos están en el período oscuro, se puede captar un número total de NxK muestras de cada una de las M/N celdas en el grupo 2 (o cualquiera de los grupos 3 a N) durante el período brillante T_B.

De esta manera, el circuito de muestreo y conversión de datos puede muestrear y convertir las señales de salida de cada celda de nanoporo en la porción de las celdas de nanoporo a una tasa de muestreo mayor al atender solo una porción de las celdas de nanoporo en una columna en un momento dado, incluso si no se cambia la velocidad global del circuito de muestreo y conversión de datos. Por lo tanto, se pueden detectar acontecimientos que tienen duraciones más cortas.

Adicionalmente o de forma alternativa, la frecuencia de la señal de control de CA (por ejemplo, V_{PRE}) se puede incrementar con o sin incremento del número de muestras captadas durante el período brillante. Como resultado, la secuenciación de una molécula de polímero con un determinado número de unidades (por ejemplo, bases) puede llevar un período de tiempo más corto debido al ciclo de CA más corto. Además, debido a que la tasa de muestreo eficaz es mayor para cada celda de nanoporo con el ciclo de CA más corto, se pueden detectar acontecimientos que tienen duraciones más cortas.

Las FIGS. 11 y 12 ilustran modos de realización donde puede no haber superposición entre los períodos brillantes de diferentes señales V_{PRE} para diferentes grupos de celdas de nanoporo. Dichos modos de realización se pueden producir cuando el período brillante de cada señal de control de CA es más corto que el período del ciclo de CA dividido entre el número de grupos N, es decir, el ciclo de trabajo de la señal de control de CA no es mayor que 1/N. Por ejemplo, cuando las celdas de nanoporo en la matriz de celdas de nanoporo se organizan en dos grupos, y el ciclo de trabajo de la señal de control de CA no es mayor de un 50 %, es decir, el período brillante es igual a o más corto que el período oscuro, no se puede producir superposición entre los períodos brillantes de las señales V_{PRE} para los dos grupos de celdas de nanoporo. Aunque se muestra que las señales V_{PRE} para diferentes grupos en las FIGS. 11 y 12 tienen algunas propiedades similares (por ejemplo, los mismos niveles de voltaje, ciclo de trabajo y tiempo de ciclo) y se pueden derivar de una misma fuente de señales por diferentes retrasos, las señales V_{PRE} para diferentes grupos pueden ser independientes entre sí, porque el electrodo de trabajo de cada celda de nanoporo puede ser independiente de los electrodos de trabajo de otras celdas de nanoporo. Por tanto, las señales V_{PRE} pueden tener diferentes niveles de voltaje, ciclos de trabajo, tiempos de ciclo y fases.

Como se describe anteriormente, en algunas implementaciones, cada celda de nanoporo puede incluir un conmutador, que se puede controlar por una señal de control de CA para conectar de forma alterna el electrodo de trabajo de la celda de nanoporo (y V_{PRE}) a un nivel de alto voltaje y a un nivel de bajo voltaje. El nivel de alto voltaje puede ser mayor que la señal $V_{LÍQ\ COMÚN}$, y el nivel de bajo voltaje puede ser menor que la señal $V_{LÍQ\ COMÚN}$. Por tanto, se pueden aplicar eficazmente señales V_{PRE} con diferentes fases a los electrodos de trabajo de diferentes grupos de celdas de nanoporo o de diferentes celdas de nanoporo individuales usando señales de control de CA digitales con diferentes fases para los conmutadores.

Como se describe anteriormente, en algunas implementaciones, las celdas de nanoporo en el chip sensor de nanoporo se pueden agrupar en base a los canales fluídicos en los que están, y se puede usar una señal $V_{LÍQ}$ de CA diferente para accionar los contraelectrodos de las celdas de nanoporo en un grupo diferente, en lugar de usar una señal V_{PRE} de CA diferente para cada grupo como se describe con respecto a la FIG. 11. En dichas implementaciones, las señales $V_{LÍQ}$ para diferentes grupos se pueden retrasar de forma diferente, de forma similar a la manera en que las señales V_{PRE} se configuran en la FIG. 11. Las salidas de las celdas de nanoporo en diferentes grupos se pueden muestrear en diferentes momentos por un circuito de muestreo compartido (por ejemplo, ADC) de una manera similar a la manera en que se muestrean las celdas de nanoporo como se describe con respecto a la FIG. 12.

C. Muestreo adaptativo y selectivo

En algunas implementaciones, las señales V_{PRE} se pueden configurar de modo que puede haber un período de superposición entre los períodos brillantes de diferentes señales V_{PRE} aplicadas a diferentes grupos de celdas de nanoporo. En dichas implementaciones, el circuito de muestreo y conversión de datos o un circuito de control se puede configurar para determinar de qué grupo de celdas de nanoporo se van a muestrear y convertir las señales de voltaje de salida durante cada período de superposición en diferentes ciclos de CA.

La FIG. 13 muestra señales (V_{PRE}) de control de ejemplo para una matriz de celdas de nanoporo, tal como la matriz de celdas de nanoporo 1000, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación. El eje horizontal de la FIG. 13 representa el tiempo durante el proceso de secuenciación. Como se muestra en la FIG. 13, el contraelectrodo de cada celda de nanoporo en la matriz de celdas de nanoporo 1000 se puede conectar a una señal $V_{LÍQ\ COMÚN}$, que puede ser un nivel de voltaje constante. Los electrodos de trabajo de las celdas de nanoporo en cada grupo de los N grupos se pueden conectar a una señal V_{PRE}, donde las señales V_{PRE} para los N grupos (es decir, V_{PRE} 1, V_{PRE} 2, ..., V_{PRE} N) están en diferentes fases entre sí. Por ejemplo, cuando el ciclo de trabajo de las señales V_{PRE} es mayor que 1/N, una o más de las señales V_{PRE} para los N grupos se pueden retrasar cada una de forma incremental con respecto a las otras por un período de tiempo más corto que el período brillante. Como resultado, puede haber un período de superposición entre los períodos brillantes de diferentes señales V_{PRE} aplicadas a diferentes grupos de celdas de nanoporo. Una ventaja de dicha implementación es que se pueden usar ciclos de trabajo con un período brillante mayor que un 50 %, o las celdas se pueden dividir en más de dos grupos y controlarse por más de dos señales con diferentes fases.

Durante el período brillante sin superposición, cada celda de nanoporo en un grupo de la matriz de celdas de nanoporo 1000 que está en el período brillante se puede muestrear a una tasa mayor (como se describe anteriormente con respecto a las FIGS. 11 y 12) que la celda de nanoporo mostrada en la FIG. 8. En algunos casos, durante el período de superposición, el circuito de muestreo y conversión de datos o un circuito de control puede determinar dinámicamente el/los grupo(s) de celdas de nanoporo que se va(n) a muestrear, mientras se ignoran las señales de salida de otro(s) grupo(s) de celdas de nanoporo que están en el período brillante de superposición. En algunos casos, durante el intervalo de superposición, la tasa de muestreo de las celdas de nanoporo en diferentes grupos en el período brillante se puede reducir puesto que las celdas de nanoporo de más de un grupo están en el período brillante. Por ejemplo, en algunos casos, la tasa de muestreo de las celdas de nanoporo en diferentes grupos en el período brillante puede estar en una tasa igual pero reducida en relación con la tasa de muestreo cuando solo un grupo está en un período brillante. En otros casos, la tasa de muestreo de las celdas de nanoporo en diferentes grupos en el período brillante puede estar en tasas reducidas y diferentes.

D. Ventajas

Las técnicas descritas en la presente divulgación posibilitan controlar las celdas de nanoporo con una granularidad mayor, tal como a un nivel de celda individual o a un nivel de grupo, en lugar de aplicar una señal de control común a todas las celdas de nanoporo. Como tal, el número de celdas en el período brillante puede ser más constante a lo largo del tiempo, y la tasa de muestreo y conversión para cada celda en el período brillante se puede incrementar sin cambiar la velocidad global del circuito de muestreo y conversión de datos, porque los recursos disponibles se utilizan más eficazmente en cualquier momento dado.

Además de incrementar la tasa de muestreo eficaz para cada celda de nanoporo para detectar acontecimientos que tienen duraciones cortas y reducir el tiempo de secuenciación como se describe anteriormente, se pueden lograr otras ventajas usando las técnicas divulgadas en el presente documento. Por ejemplo, el ancho de banda del circuito de muestreo y conversión de datos se puede utilizar completamente en cualquier momento dado para captar muestras de datos que sean útiles para la secuenciación. Por tanto, puede ser posible desarrollar un chip sensor de nanoporos con una mayor densidad o un mayor número de celdas. Adicionalmente o de forma alternativa, con datos reducidos muestreados captados de celdas en el período oscuro, se puede reducir la cantidad de datos que se van a transportar desde el chip sensor de nanoporos y procesar por circuitos de almacenamiento o procesamiento posteriores, lo que puede reducir el coste del sistema de secuenciación porque se pueden usar circuitos con menor rendimiento (por ejemplo, velocidad o ancho de banda) o capacidad (por ejemplo, espacio de memoria o canales de datos).

Además, debido a que algunas celdas de nanoporo están en el período oscuro mientras que otras celdas de nanoporo están en el período brillante durante el mismo tiempo y debido a que un $V_{LÍQ}$ se aplica a (se comparte por) los contraelectrodos de todas las celdas, la corriente total en el contraelectrodo se puede reducir al menos parcialmente en cualquier momento dado. Esto se provoca por las polaridades opuestas de la corriente de las celdas en el período oscuro y la corriente de las celdas en el período brillante, donde los electrones que fluyen hacia el contraelectrodo y los electrones que fluyen fuera del electrodo pueden provocar que la corriente neta en el contraelectrodo se reduzca. Además, debido a la naturaleza de CA de la señal V_{PRE}, la corriente en el contraelectrodo y el electrodo de trabajo para cada celda también se puede equilibrar a lo largo del tiempo.

En algunas implementaciones, en lugar de ser un nivel de voltaje constante, la señal $V_{LÍQ}$ aplicada a los

contraelectrodos también puede ser una señal de CA, pero a una frecuencia menor que la señal V_{PRE} aplicada a los electrodos de trabajo. De esta manera, incluso si existe algún desequilibrio entre la corriente de las celdas en el período oscuro y la corriente de las celdas en el período brillante (por ejemplo, debido a que el ciclo de trabajo es diferente de un 50 % y un número de grupos de celdas de nanoporo en el período oscuro puede ser diferente de un número de grupos de celdas de nanoporo en el período brillante) en un momento dado, la corriente global en el contraelectrodo se puede equilibrar a lo largo del tiempo. Como tal, se puede reducir la caída de voltaje en el contraelectrodo y, por tanto, el desplazamiento del voltaje de salida.

V. Control del intervalo de entrada del ADC

En muchos casos, los niveles de voltaje en el condensador integrador (por ejemplo, el condensador integrador 408 (n_{con})) que se van a medir se pueden agrupar dentro de determinados intervalos más pequeños. Por tanto, es posible que el intervalo dinámico de un ADC no se utilice completamente si el intervalo de entrada del ADC es fijo. Para utilizar completamente el intervalo dinámico del ADC, el intervalo de entrada del ADC se puede cambiar dinámicamente cambiando de forma adaptativa los niveles de referencia del ADC en base al nivel de voltaje estimado que se va a medir.

En un ADC, el intervalo de entrada de escala completa y el voltaje de modo común del ADC pueden depender de los niveles de referencia del ADC, tal como el nivel de referencia positivo (V_{REFP}) y el nivel de referencia negativo (V_{REFN}). El voltaje de modo común puede ser el promedio de V_{REFP} y V_{REFN}. Cuando una señal que se va a muestrear por el ADC está en un nivel de voltaje cercano a V_{REFN}, la entrada del ADC puede estar cercana a una escala cero, es decir, la salida del ADC puede representar un valor cercano al valor más bajo posible; el código de salida exacto puede depender del esquema de codificación del ADC, que puede incluir, por ejemplo, binario recto, binario desviado, complemento de dos, etc.

Cuando una señal que se va a muestrear por el ADC está en un nivel de voltaje cercano a V_{REFP}, la entrada del ADC puede estar cercana a una escala completa, y la salida del ADC puede representar un valor cercano al valor más alto posible. Para utilizar completamente el intervalo dinámico del ADC (es decir, el intervalo de amplitudes de señal que el ADC puede resolver), es deseable que el nivel de señal de entrada se distribuya más completamente entre V_{REFP} y V_{REFN}, en lugar de agruparse dentro de determinados intervalos más pequeños. Para un ADC de 8 bits, si el nivel de señal de entrada está entre 0 V y 1 V, V_{REFP} se puede establecer en 1 V y V_{REFN} se puede establecer en 0 V; y el ADC puede diferenciar dos niveles de señal con una diferencia mayor que aproximadamente 4 mV. Si el nivel de señal de entrada está entre 0,25 V y 0,5 V, V_{REFP} se puede establecer en 0,5 V y V_{REFN} se puede establecer en 0,25 V; y el ADC puede diferenciar dos niveles de señal con una diferencia mayor que aproximadamente 1 mV.

Sin embargo, como se muestra en la FIG. 11 o 13, en algunos casos, es posible que los niveles de voltaje de los condensadores integradores que se van a muestrear por el ADC no se distribuyan en el intervalo completo entre el nivel de bajo voltaje y el nivel de alto voltaje de las señales V_{PRE}. Por tanto, con niveles de referencia fijos (V_{REFP} y V_{REFN}) del ADC, es posible que el intervalo dinámico del ADC no se utilice completamente ya que los códigos de salida pueden incluir solo una porción de todos los códigos posibles (por ejemplo, 256 códigos diferentes para un ADC de 8 bits) o, en otras palabras, es posible que los niveles de señal no se resuelvan con la máxima resolución posible del ADC.

La FIG. 14A muestra niveles de referencia fijos para un ADC en un chip sensor de nanoporos. Como se muestra en la FIG. 14A, los niveles de voltaje 1430 de los condensadores integradores que se van a muestrear por el ADC pueden estar cercanos al nivel de bajo voltaje 1410 de V_{PRE} o al nivel de alto voltaje 1420 de V_{PRE}. Por tanto, para incluir todos estos niveles de voltaje en el intervalo de entrada del ADC, V_{REFP} para el ADC se puede establecer en un nivel ligeramente por encima del nivel de alto voltaje 1420 de V_{PRE} para evitar la saturación (por ejemplo, provocada por sobreimpulso) y/o distorsión cerca de la entrada de escala completa. V_{REFN} para el ADC se puede establecer en un nivel ligeramente por debajo del nivel de bajo voltaje 1410 de V_{PRE}. Sin embargo, ningún nivel de voltaje de los condensadores integradores se encuentra en la porción media (mostrada como la región estampada 1440) del intervalo de entrada. Por lo tanto, es posible que el intervalo medio del intervalo de entrada de escala completa del ADC no se use en absoluto, y es posible que el intervalo dinámico del ADC no se utilice completamente. Para utilizar completamente el intervalo dinámico del ADC, los niveles de referencia del ADC se pueden cambiar dinámicamente de modo que el intervalo de entrada del ADC no incluya la región estampada 1440.

La FIG. 14B ilustra niveles de referencia variables para un ADC en un chip sensor de nanoporos. Los niveles de referencia incluyen niveles de referencia V_{REFP} y V_{REFN}, que determinan el intervalo de entrada de escala completa y el voltaje de modo común del ADC. Los niveles de referencia V_{REFP} y V_{REFN} pueden cambiar con la señal V_{PRE} que provoca que la celda de nanoporo entre en períodos brillantes y oscuros. Por lo tanto, el intervalo de entrada de escala completa y/o el modo común del ADC pueden ser diferentes durante los períodos brillantes y oscuros. De esta forma, las señales de voltaje de salida de las celdas de nanoporo se pueden ajustar mejor dentro del intervalo de entrada de escala completa del ADC, en lugar de distribuirse solo dentro de determinados intervalos estrechos del intervalo de entrada de escala completa del ADC.

Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 14B, para captar una muestra de datos 1430 en el período oscuro, se puede establecer V_{REFP} en un nivel 1450 por debajo de $V_{LÍQ}$. Se puede establecer V_{REFN} en un nivel 1460 por debajo del nivel de bajo voltaje 1455 de V_{PRE}, de modo que el intervalo de entrada del ADC (mostrado como la región sombreada) solo incluye regiones por debajo de $V_{LÍQ}$ y entre el nivel 1450 y 1460, pero no incluye la región por encima del nivel 1450 donde no se encuentra dentro ningún nivel de voltaje de los condensadores integradores. Para captar muestras de datos en el período brillante, se puede establecer V_{REFP} en un nivel 1470 por encima del nivel de alto voltaje 1475 de V_{PRE}, y se puede establecer V_{REFN} en un nivel 1480 por encima de $V_{LÍQ}$. Por lo tanto, el intervalo de entrada del ADC (mostrado como la región sombreada) solo puede incluir las regiones por encima de $V_{LÍQ}$ y entre los niveles 1470 y 1480, pero no incluye la región por debajo del nivel 1480 donde no se encuentra dentro ningún nivel de voltaje de los condensadores integradores. Se puede usar la misma configuración de referencia durante el período oscuro 1490 de un grupo cuando no se captan muestras de datos de celdas de nanoporo en el grupo y se captan muestras de datos de celdas de nanoporo en otros grupos que están en el período brillante.

De esta manera, el intervalo de entrada (y la entrada de modo común) del ADC se puede cambiar dinámicamente para incluir solo los intervalos en los que se pueden encontrar los niveles de voltaje de los condensadores integradores. Por lo tanto, los niveles de voltaje dentro del intervalo de entrada se pueden resolver con la máxima resolución posible del ADC.

VI. Procedimiento de ejemplo de incremento de la tasa de muestreo por celda

La FIG. 15 es un diagrama de flujo 1500 que ilustra un procedimiento de ejemplo de secuenciación de ácidos nucleicos usando un sensor que incluye un conjunto de celdas, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación. El procedimiento ilustrado por el diagrama de flujo 1500 puede aplicar señales de CA con diferentes fases a diferentes grupos de celdas de nanoporo en un chip sensor de nanoporos. Como resultado, cuando algunas celdas de nanoporo están en el período oscuro, otras celdas de nanoporo están en el período brillante y se están muestreando por un circuito de muestreo y conversión compartido. Por tanto, el procedimiento puede reducir el número de celdas a las que se da servicio por el circuito de muestreo y conversión en cualquier instante de tiempo y, por tanto, incrementar la tasa de muestreo por celda sin usar un circuito de muestreo y conversión de datos más rápido.

En el bloque 1510, un primer circuito, tal como el circuito 622 de la FIG. 6, puede aplicar una primera señal de CA a un primer grupo de celdas de un conjunto de celdas en un chip sensor de nanoporos. Como se describe anteriormente con respecto a la FIG. 10, el conjunto de celdas en el chip sensor de nanoporos se puede organizar en múltiples grupos, donde cada grupo puede ser independiente de otro grupo y tener un circuito correspondiente para aplicar una señal de CA al primer grupo de celdas de nanoporo. La señal de CA puede ser una onda rectangular y puede tener un ciclo de trabajo seleccionado. La señal de CA se puede aplicar a un electrodo de trabajo de cada celda de nanoporo en el grupo, por ejemplo, el electrodo de trabajo 402 de la celda de nanoporo 400 en la FIG. 4 o el electrodo de trabajo 602 en la FIG. 6.

En el bloque 1520, un segundo circuito puede aplicar una segunda señal de CA a un segundo grupo de celdas del conjunto de celdas. En algunos modos de realización, la primera señal de CA y la segunda señal de CA pueden tener diferentes fases y se pueden derivar de una misma fuente de señales por diferentes retrasos. En algunos modos de realización, la primera señal de CA y la segunda señal de CA también pueden ser diferentes en al menos uno de amplitud, ciclo de trabajo o frecuencia.

En el bloque 1530, durante una primera porción de la primera señal de CA, el primer grupo de celdas puede estar en el período brillante y un convertidor de analógico a digital puede muestrear las señales de salida del primer grupo de celdas. Durante el mismo período de tiempo, el segundo grupo de celdas puede estar en el período oscuro debido a la diferencia de fase entre la primera señal de CA y la segunda señal de CA, y las señales de salida del segundo grupo de celdas pueden no muestrearse por el convertidor de analógico a digital. Por tanto, durante la primera porción de la primera señal de CA, el convertidor de analógico a digital solo puede atender los primeros grupos de celdas.

En el bloque 1540, durante una segunda porción de la primera señal de CA, el primer grupo de celdas puede estar en el período oscuro y el convertidor de analógico a digital puede no muestrear las señales de salida del primer grupo de celdas. Durante el mismo período de tiempo, el segundo grupo de celdas puede estar en el período brillante y las señales de salida del segundo grupo de celdas se pueden muestrear por el convertidor de analógico a digital. Por tanto, durante la segunda porción de la primera señal de CA, el convertidor de analógico a digital solo puede atender los segundos grupos de celdas. En algunos modos de realización como se muestra en la FIG. 11, puede que no haya superposición entre el período brillante del primer grupo de celdas y el período brillante del segundo grupo de celdas. En otros modos de realización como el que se muestra en la FIG. 13, el período brillante del primer grupo de celdas y el período brillante del segundo grupo de celdas se pueden superponer parcialmente, y se pueden usar diferentes esquemas para determinar cómo las señales de salida de los dos grupos de celdas se pueden muestrear por el convertidor de analógico a digital, como se describe anteriormente con respecto a la FIG.

13.

Cabe señalar que aunque la FIG. 15 describe el procesamiento de datos como un procedimiento secuencial, muchas de las operaciones se pueden realizar en paralelo o simultáneamente. Además, se puede reorganizar el orden de las operaciones. Una operación puede tener etapas adicionales no incluidas en la figura. Algunas operaciones pueden ser opcionales y, por tanto, se pueden omitir en diversos modos de realización. Algunas operaciones descritas en un bloque se pueden realizar conjuntamente con las operaciones en otro bloque. Por ejemplo, algunas operaciones se pueden realizar en paralelo. Además, los modos de realización de los procedimientos se pueden implementar en equipo físico, programa informático, soporte lógico inalterable (*firmware*), programa informático intermedio (*middleware*), microcódigo, lenguajes de descripción de equipo informático o cualquier combinación de los mismos.

VII. Sistema informático

Cualquiera de los sistemas informáticos mencionados en el presente documento puede utilizar cualquier número adecuado de subsistemas. Los ejemplos de dichos subsistemas se muestran en la FIG. 16 en el sistema informático 10. En algunos modos de realización, un sistema informático incluye un único aparato informático, donde los subsistemas pueden ser los componentes del aparato informático. En otros modos de realización, un sistema informático puede incluir múltiples aparatos informáticos, siendo cada uno un subsistema, con componentes internos. Un sistema informático puede incluir ordenadores de escritorio y portátiles, tabletas, teléfonos móviles y otros dispositivos móviles.

Los subsistemas mostrados en la FIG. 16 se interconectan por medio de un bus de sistema 75. Se muestran subsistemas adicionales, tales como una impresora 74, teclado 78, dispositivo(s) de almacenamiento 79, monitor 76, que se acopla al adaptador de pantalla 82 y otros. Los periféricos y dispositivos de entrada/salida (E/S), que se acoplan al controlador de E/S 71, se pueden conectar al sistema informático por cualquier número de medios conocidos en la técnica, tales como el puerto de entrada/salida (E/S) 77 (por ejemplo, USB, FireWire®). Por ejemplo, se puede usar el puerto de E/S 77 o la interfaz externa 81 (por ejemplo, Ethernet, wifi, etc.) para conectar el sistema informático 10 a una red de área amplia tal como Internet, un dispositivo de entrada de ratón o un escáner. La interconexión por medio del bus de sistema 75 permite que el procesador central 73 se comunique con cada subsistema y controle la ejecución de una pluralidad de instrucciones desde la memoria de sistema 72 o el/los dispositivo(s) de almacenamiento 79 (por ejemplo, un disco fijo, tal como un disco duro, o disco óptico), así como el intercambio de información entre subsistemas. La memoria de sistema 72 y/o el/los dispositivo(s) de almacenamiento 79 pueden incorporar un medio legible por ordenador. Otro subsistema es un dispositivo de recopilación de datos 85, tal como una cámara, micrófono, acelerómetro y similares. Cualquiera de los datos mencionados en el presente documento se puede enviar desde un componente a otro componente y se puede enviar al usuario.

Un sistema informático puede incluir una pluralidad de los mismos componentes o subsistemas, por ejemplo, conectados entre sí por la interfaz externa 81, por una interfaz interna o por medio de dispositivos de almacenamiento extraíbles que se pueden conectar y retirar de un componente a otro componente. En algunos modos de realización, los sistemas, subsistema o aparatos informáticos se pueden comunicar sobre una red. En dichos casos, un ordenador se puede considerar un cliente y otro ordenador un servidor, donde cada uno puede ser parte de un mismo sistema informático. Un cliente y un servidor pueden incluir cada uno múltiples sistemas, subsistemas o componentes.

Los aspectos de los modos de realización se pueden implementar en forma de lógica de control usando un equipo físico (por ejemplo, un circuito integrado específico de la aplicación o una matriz de puertas programables en campo) y/o usando un programa informático de ordenador con un procesador en general programable de forma modular o integrada. Como se usa en el presente documento, un procesador incluye un procesador de un único núcleo, un procesador de múltiples núcleos en un mismo chip integrado o múltiples unidades de procesamiento en una única placa de circuito o en red. En base a la divulgación y las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, un experto en la técnica conocerá y apreciará otras maneras y/o procedimientos para implementar los modos de realización de la presente invención usando equipo físico y una combinación de equipo físico y programa informático.

Cualquiera de los componentes o funciones de programa informático descritos en esta solicitud se puede implementar como código de programa informático para ejecutarse por un procesador usando cualquier lenguaje informático adecuado tal como, por ejemplo, Java, C, C++, C#, Objective-C, Swift, o lenguaje de programación tal como Perl o Python usando, por ejemplo, técnicas convencionales u orientadas a objetos. El código de programa informático se puede almacenar como una serie de instrucciones o comandos en un medio legible por ordenador para su almacenamiento y/o transmisión. Un medio legible por ordenador no transitorio adecuado puede incluir memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de solo lectura (ROM), un medio magnético, tal como un disco duro, o un disquete, o un medio óptico, tal como un disco compacto (CD) o DVD (disco versátil digital), memoria *flash* y similares. El medio legible por ordenador puede ser cualquier combinación de dichos dispositivos de almacenamiento o transmisión.

Dichos programas también se pueden codificar y transmitir usando señales portadoras adaptadas para su transmisión por medio de redes por cable, ópticas y/o inalámbricas que se ajusten a una variedad de protocolos, incluyendo Internet. Como tal, se puede crear un medio legible por ordenador usando una señal de datos codificada con dichos programas. Los medios legibles por ordenador codificados con el código de programa se pueden envasar en un dispositivo compatible o se pueden proporcionar por separado desde otros dispositivos (por ejemplo, por medio de una descarga de Internet). Cualquier medio legible por ordenador de este tipo puede residir en o dentro de un único producto informático (por ejemplo, un disco duro, un CD o un sistema informático completo) y puede estar presente en o dentro de diferentes productos informáticos dentro de un sistema o red. Un sistema informático puede incluir un monitor, impresora u otra pantalla adecuada para proporcionar cualquiera de los resultados mencionados en el presente documento a un usuario.

Cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento se puede realizar total o parcialmente con un sistema informático que incluya uno o más procesadores, que se pueden configurar para realizar las etapas. Por tanto, los modos de realización útiles para entender la invención se pueden referir a sistemas informáticos configurados para realizar las etapas de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, potencialmente realizando diferentes componentes una etapa respectiva o un grupo respectivo de etapas. Aunque se presentan como etapas numeradas, las etapas de los procedimientos en el presente documento se pueden realizar a un mismo tiempo o en un orden diferente. Adicionalmente, porciones de estas etapas se pueden usar con porciones de otras etapas de otros procedimientos. Además, la totalidad o porciones de una etapa pueden ser opcionales. Adicionalmente, cualquiera de las etapas de cualquiera de los procedimientos se puede realizar con módulos, unidades, circuitos u otros medios para realizar estas etapas.

Los detalles específicos de modos de realización particulares se pueden combinar de cualquier forma adecuada sin apartarse del alcance de los modos de realización de la invención. Sin embargo, otros modos de realización de la invención se pueden referir a modos de realización específicos relacionados con cada aspecto individual, o combinaciones específicas de estos aspectos individuales.

La descripción anterior de modos de realización de ejemplo de la invención se ha presentado para los propósitos de ilustración y descripción. No se pretende que sea exhaustiva o que limite la invención a la forma precisa descrita, y son posibles muchas modificaciones y variaciones en vista de la enseñanza anterior.

Una mención de "un", "una" o "el/la" pretende querer decir "uno o más", a menos que se indique específicamente lo contrario. El uso de "o" pretende querer decir un "o incluyente" y no un "o excluyente" a menos que se indique específicamente lo contrario. La referencia a un "primer" componente no requiere necesariamente que se proporcione un segundo componente. Además, la referencia a un "primer" o un "segundo" componente no limita el componente al que se hace referencia a una localización particular a menos que se establezca expresamente.

REIVINDICACIONES

1. Un chip sensor para secuenciación de ácidos nucleicos, comprendiendo el chip sensor:

un primer conjunto de celdas adecuadas para contener un nanoporo organizadas en N grupos, siendo N un número entero de dos o más, teniendo cada celda un electrodo de celda que se configura para proporcionar una señal de CA a la celda para caracterizar un nucleótido de una molécula de ácido nucleico; y

al menos N circuitos, configurado cada circuito de los al menos N circuitos para proporcionar una señal de CA configurable por separado a uno o más electrodos de celda de un grupo respectivo de una o más celdas de los N grupos, en el que los N circuitos se configuran para proporcionar señales de CA con diferentes fases a diferentes grupos de una o más celdas en los N grupos.

2. El chip sensor de la reivindicación 1, en el que cada celda del primer conjunto de celdas incluye:

un electrodo común configurado para proporcionar una segunda señal a la celda, compartido el electrodo común por dos o más celdas del primer conjunto de celdas.

3. El chip sensor de la reivindicación 2, en el que cada celda del primer conjunto de celdas incluye además un nanoporo situado entre el electrodo de celda y el electrodo común, en el que el nanoporo se configura para recibir una marca conectada a un nucleótido y actuar como una resistencia variable entre el electrodo de celda y el electrodo común.

4. El chip sensor de la reivindicación 2, en el que:

cada celda del primer conjunto de celdas incluye un condensador integrador acoplado al electrodo de celda; y

cada circuito de los al menos N circuitos se configura para precargar los condensadores integradores de un grupo respectivo de una o más celdas de los N grupos con la señal de CA.

5. El chip sensor de la reivindicación 4, en el que los condensadores integradores precargados de un grupo de una o más celdas se configuran para cargarse o descargarse por la segunda señal.

6. El chip sensor de la reivindicación 2, que comprende además un circuito de muestreo acoplado al primer conjunto de celdas, en el que:

los N circuitos se configuran para proporcionar diferentes señales de CA a los N grupos; y

el circuito de muestreo se configura para muestrear selectivamente señales de voltaje de uno o más grupos de una o más celdas de los N grupos en base a las señales de CA proporcionadas a los N grupos.

7. El chip sensor de la reivindicación 1, que comprende además:

un segundo conjunto de celdas organizadas en N grupos, teniendo cada celda del segundo conjunto de celdas un electrodo de celda que se configura para proporcionar una señal de CA a la celda para caracterizar un nucleótido de una molécula de ácido nucleico,

en el que cada circuito de los al menos N circuitos se configura para proporcionar una señal de CA configurable por separado a uno o más electrodos de celda de un grupo respectivo de los N grupos del primer conjunto de celdas y a uno o más electrodos de celda de un grupo respectivo de los N grupos del segundo conjunto de celdas.

8. El chip sensor de la reivindicación 1 que comprende además dos o más canales fluídicos, en el que las celdas en diferentes canales fluídicos se organizan en diferentes grupos de los N grupos.

9. El chip sensor de la reivindicación 1, en el que:

cada circuito de los al menos N circuitos incluye un conmutador, configurado el conmutador para conectar de forma alterna un electrodo de celda a dos niveles de voltaje; y

cada conmutador se controla por una señal de control de CA.

10. El chip sensor de la reivindicación 1, en el que:

cada celda del primer conjunto de celdas incluye un conmutador, configurado el conmutador para conectar

de forma alterna un electrodo de celda a dos niveles de voltaje;

cada conmutador se controla por una señal de control de CA;

cada circuito de los al menos N circuitos incluye uno o más conmutadores de las una o más celdas del grupo respectivo; y

los uno o más conmutadores de las una o más celdas en el grupo respectivo reciben una misma señal de control de CA.

11. Un chip sensor para secuenciación de ácidos nucleicos que comprende:

un primer conjunto de celdas adecuadas para contener un nanoporo organizadas en N grupos, siendo N un número entero de dos o más, teniendo cada celda un electrodo de celda que se configura para proporcionar una señal de CA a la celda para caracterizar un nucleótido de una molécula de ácido nucleico;

un convertidor de analógico a digital (ADC) acoplado al primer conjunto de celdas y configurado para convertir las señales de salida del primer conjunto de celdas; y

un circuito de control configurado para:

aplicar una primera señal de CA a un primer grupo de celdas de los N grupos de celdas;

aplicar una segunda señal de CA a un segundo grupo de celdas de los N grupos de celdas, en el que la primera señal de CA y la segunda señal de CA tienen diferentes fases; y

durante una primera porción de la primera señal de CA, provocar que el ADC convierta las señales de salida del primer grupo de celdas y no convierta las señales de salida del segundo grupo de celdas.

12. Un procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos que usa un chip sensor que incluye un conjunto de celdas de nanoporo, comprendiendo el procedimiento:

aplicar una primera señal de CA a un primer grupo de celdas del conjunto de celdas;

aplicar una segunda señal de CA a un segundo grupo de celdas del conjunto de celdas, en el que la primera señal de CA y la segunda señal de CA tienen diferentes fases;

durante una primera porción de la primera señal de CA, muestrear, usando un convertidor de analógico a digital (ADC), las señales de salida del primer grupo de celdas y no muestrear las señales de salida del segundo grupo de celdas; y

durante una segunda porción de la primera señal de CA, muestrear, usando el ADC, las señales de salida del segundo grupo de celdas y no muestrear las señales de salida del primer grupo de celdas.

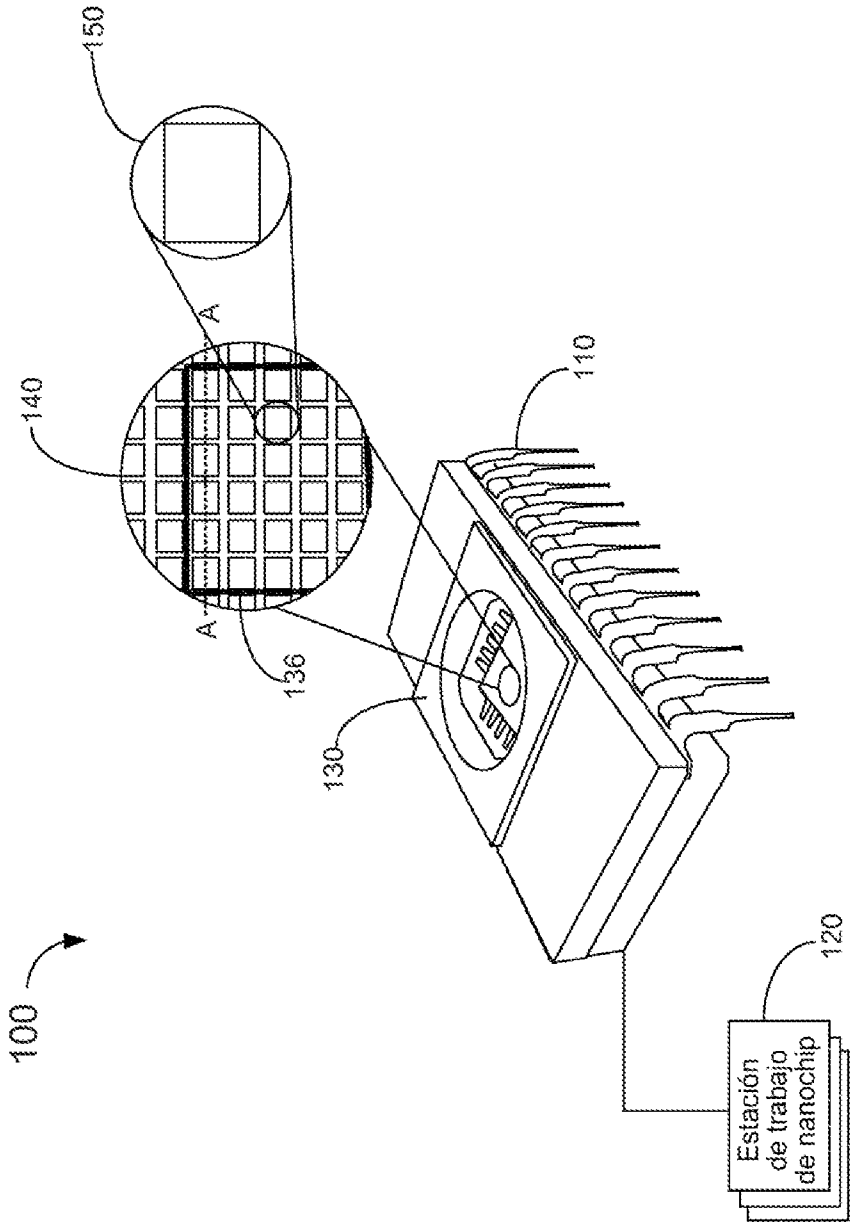

150
A
140
110
A
136
130
100
120
Estación de trabajo de nanochip

FIG. 1

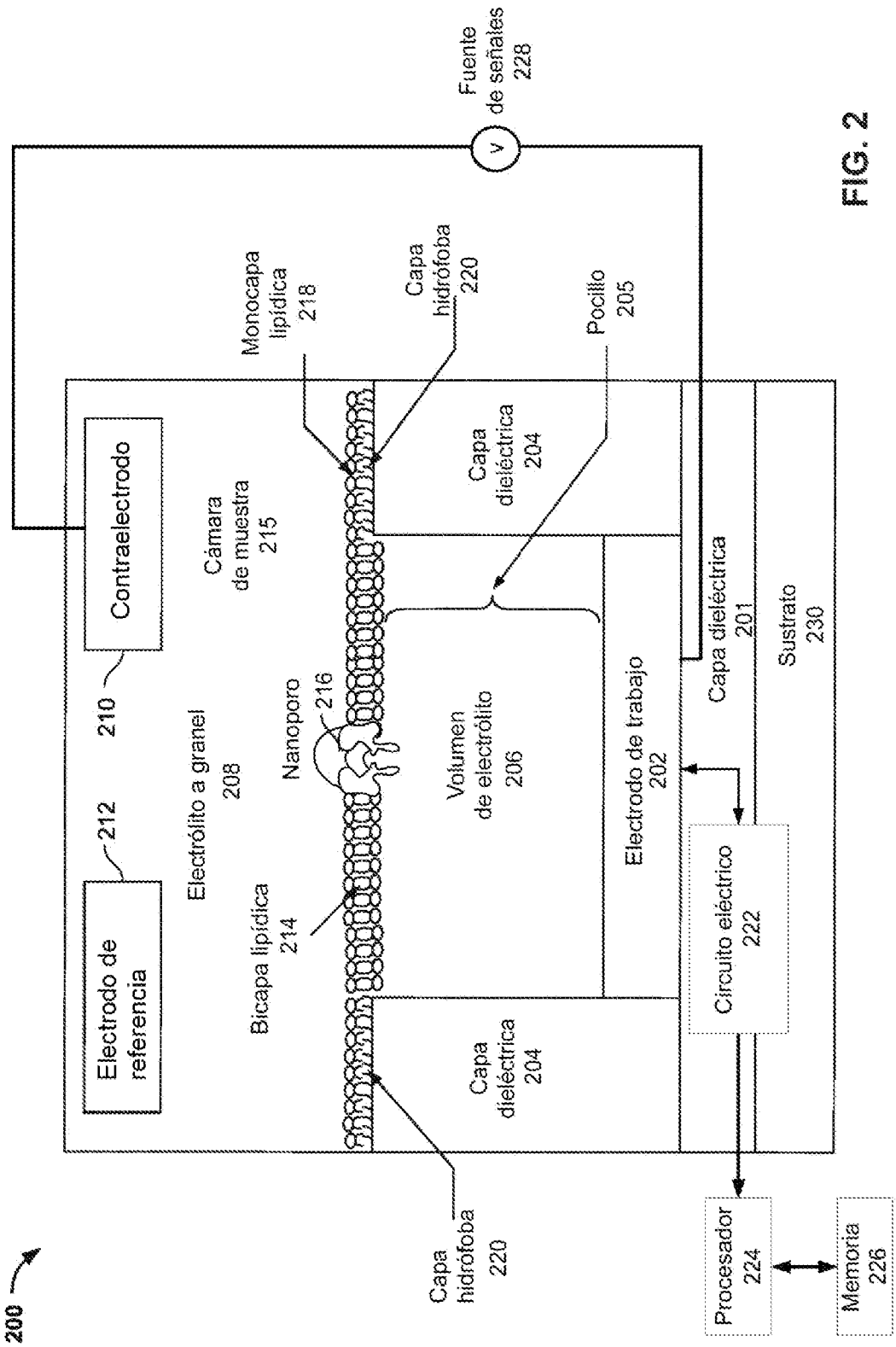

200
Fuente de señales 228
V
Monocapa lipídica 218
Capa hidrófoba 220
Pocillo 205
Contraelectrodo
210
Cámara de muestra 215
Capa dieléctrica 204
Capa dieléctrica 201
Sustrato 230
Electrodo de referencia
212
Electrólito a granel 208
Nanoporo 216
Volumen de electrólito 206
Electrodo de trabajo 202
Bicapa lipídica 214
Circuito eléctrico 222
Capa dieléctrica 204
Capa hidrófoba 220
Procesador 224
Memoria 226

FIG. 2

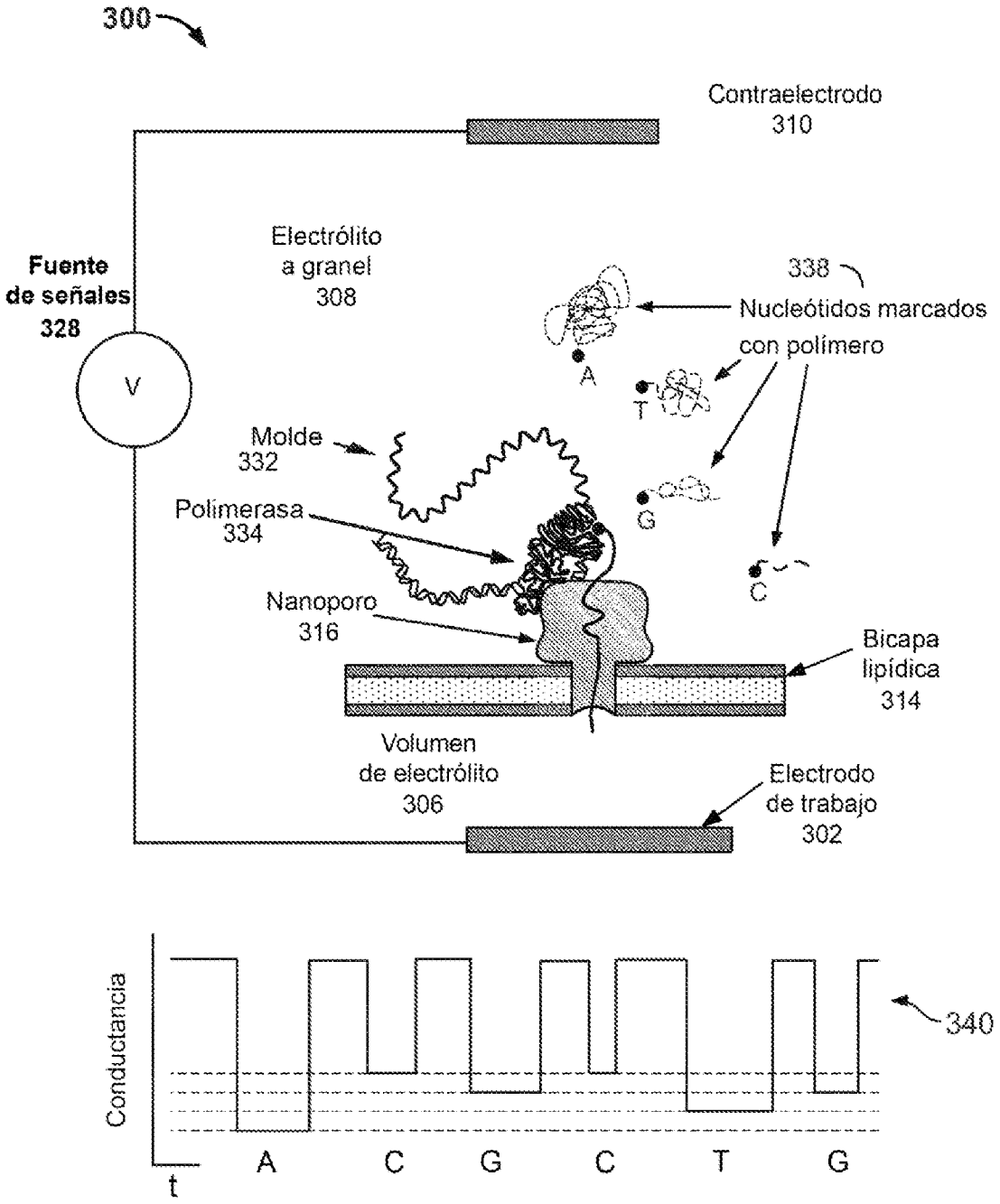

300
Contraelectrodo
310
Electrólito
a granel
308
Fuente
de señales
328
V
338
Nucleótidos marcados
con polímero
A
T
G
C
Molde
332
Polimerasa
334
Nanoporo
316
Bicapa
lipídica
314
Volumen
de electrólito
306
Electrodo
de trabajo
302
Conductancia
t
A
C
G
C
T
G
340

FIG. 3

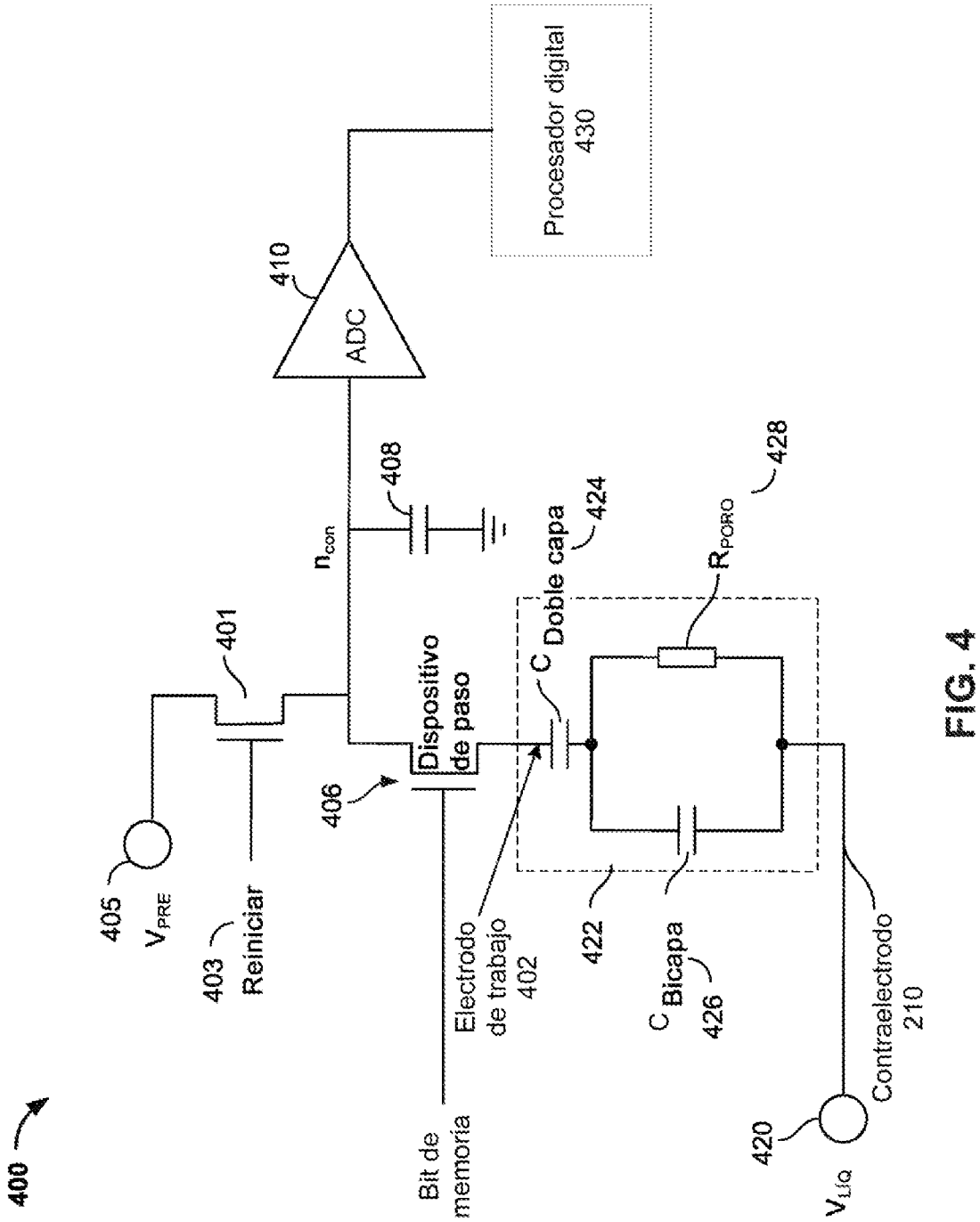

400
405
V_{PRE}
403
Reiniciar
401
406
Dispositivo de paso
Electrodo de trabajo 402
Bit de memoria
n_{con}
408
410
ADC
Procesador digital 430
C Doble capa
424
R_{PORO}
428
422
C Bicapa
426
420
V_{Liq}
Contraelectrodo 210

FIG. 4

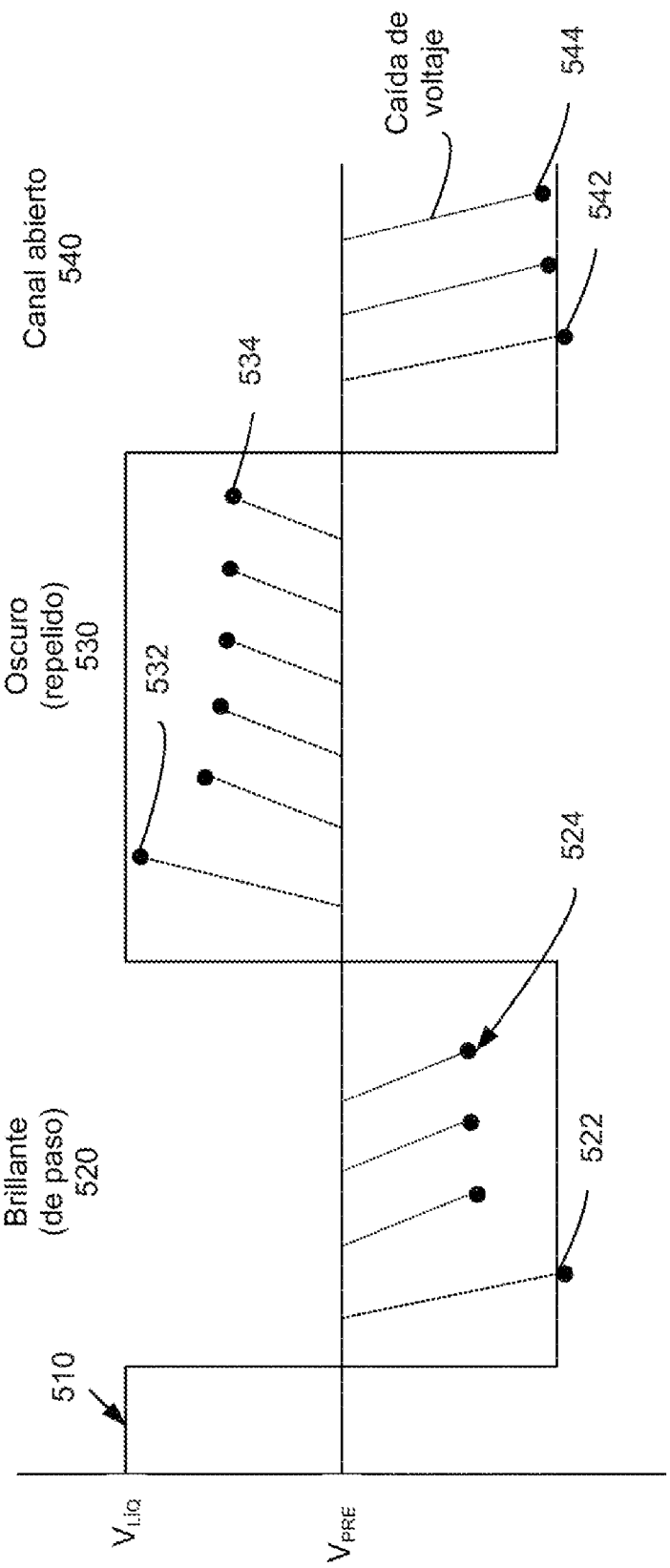

Caída de voltaje
544
542
Canal abierto
540
534
Oscuro
(repelido)
530
532
524
Brillante
(de paso)
520
522
510
V_{LIQ}
V_{PRE}

FIG. 5

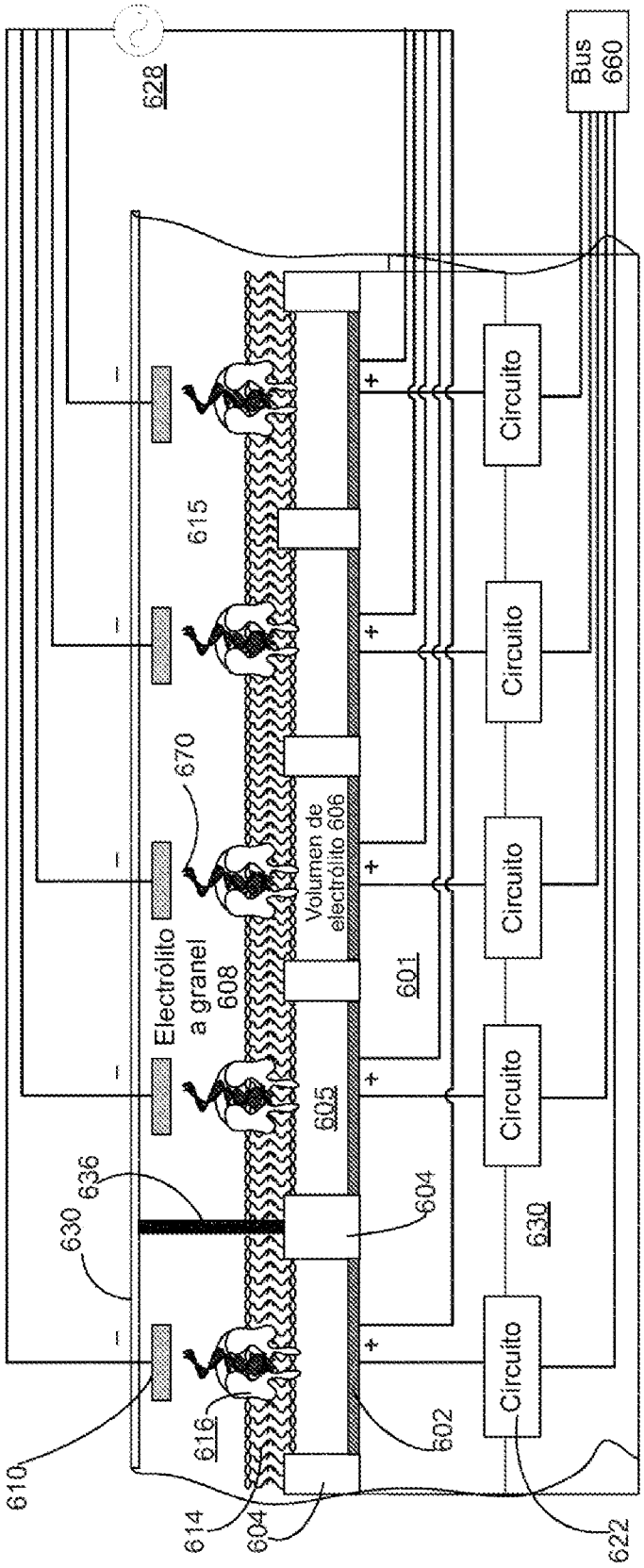

600
628
Bus 660
Circuito
615
670
Volumen de electrólito 606
Electrólito a granel 608
601
605
604
636
630
616
610
614
602
622

FIG. 6

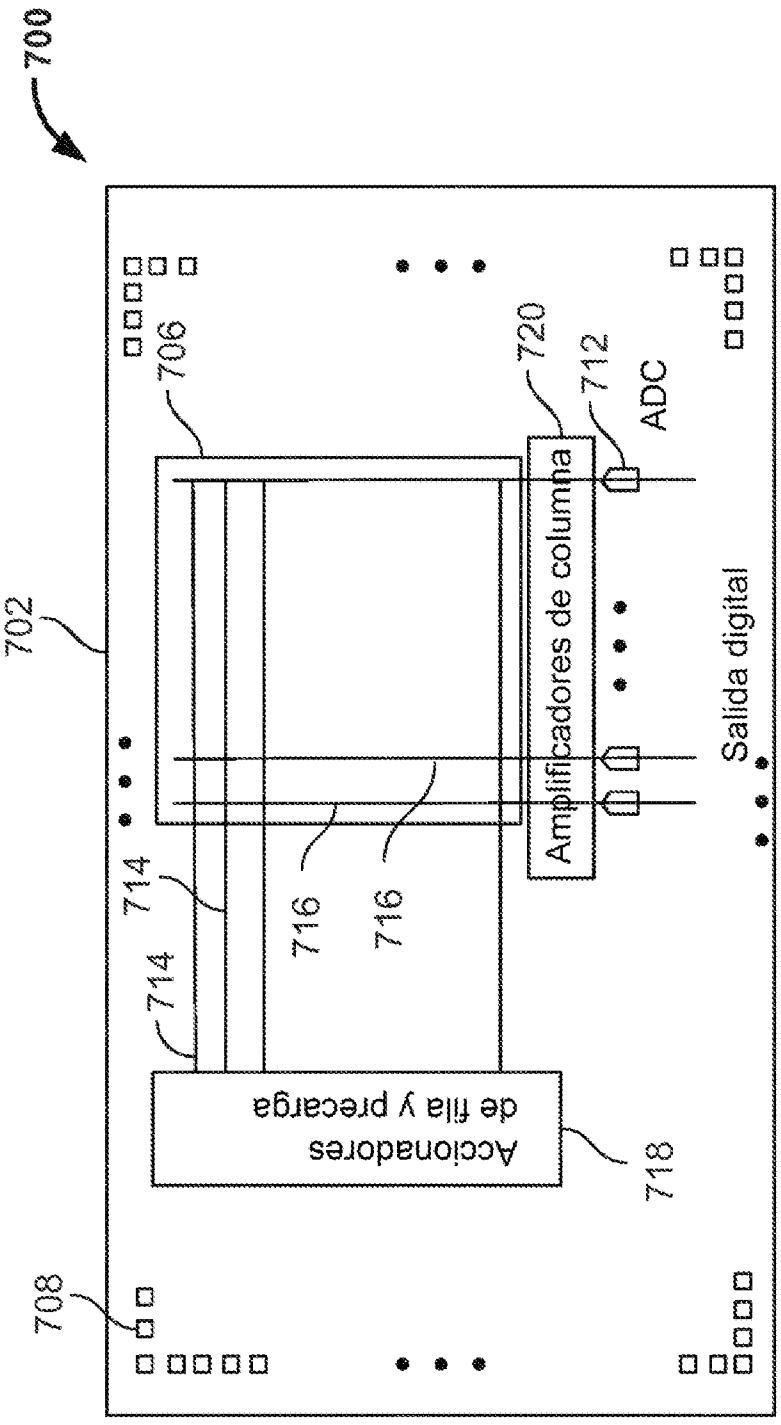

700
702
706
720
712
ADC
Amplificadores de columna
Salida digital
714
714
716
716
Accionadores
de fila y precarga
718
708

FIG. 7

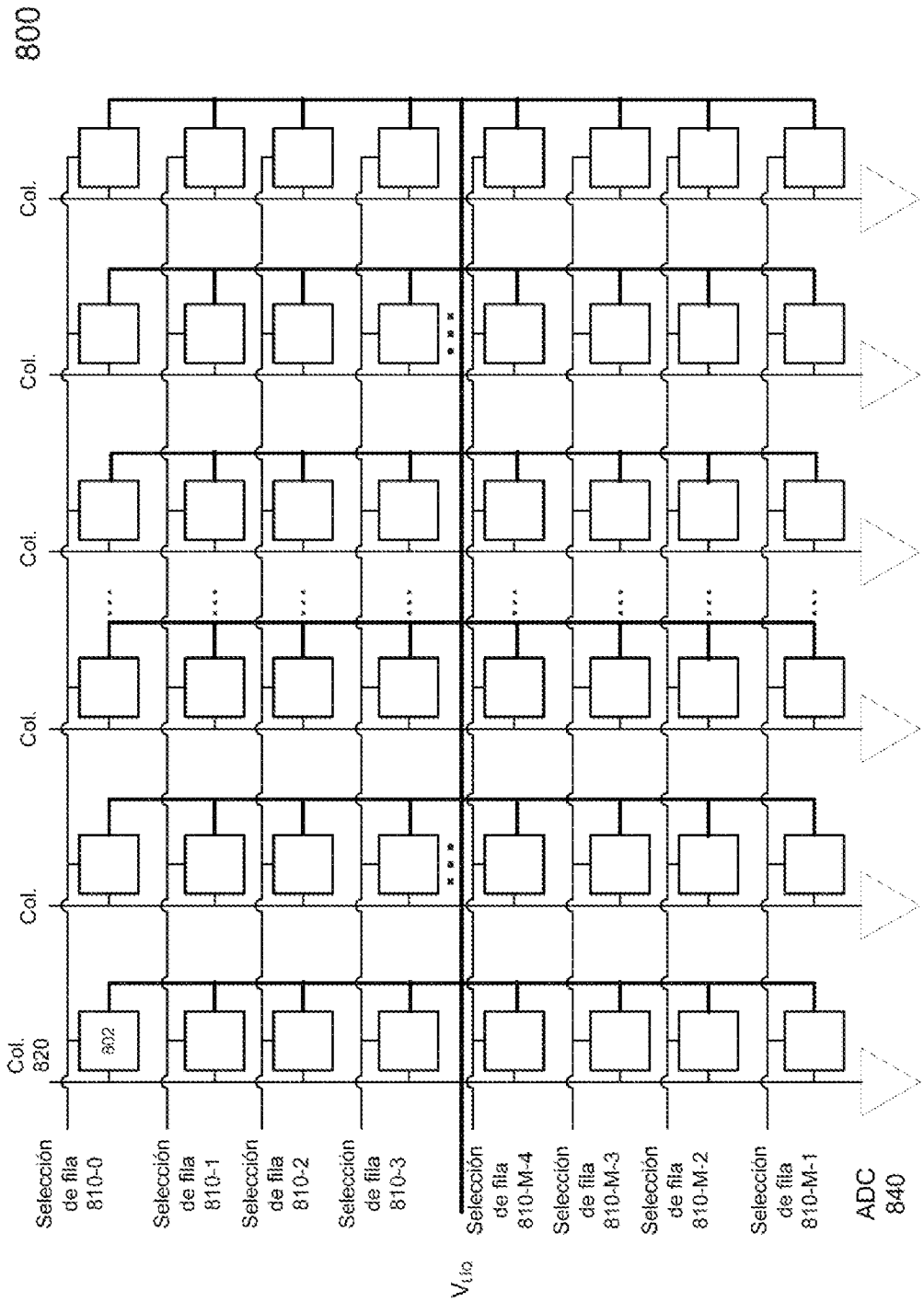

800
Col.
820
802
Col.
Col.
Col.
Col.
Selección de fila 810-0
Selección de fila 810-1
Selección de fila 810-2
Selección de fila 810-3
Selección de fila 810-M-4
Selección de fila 810-M-3
Selección de fila 810-M-2
Selección de fila 810-M-1
V_{tio}
ADC 840

FIG. 8

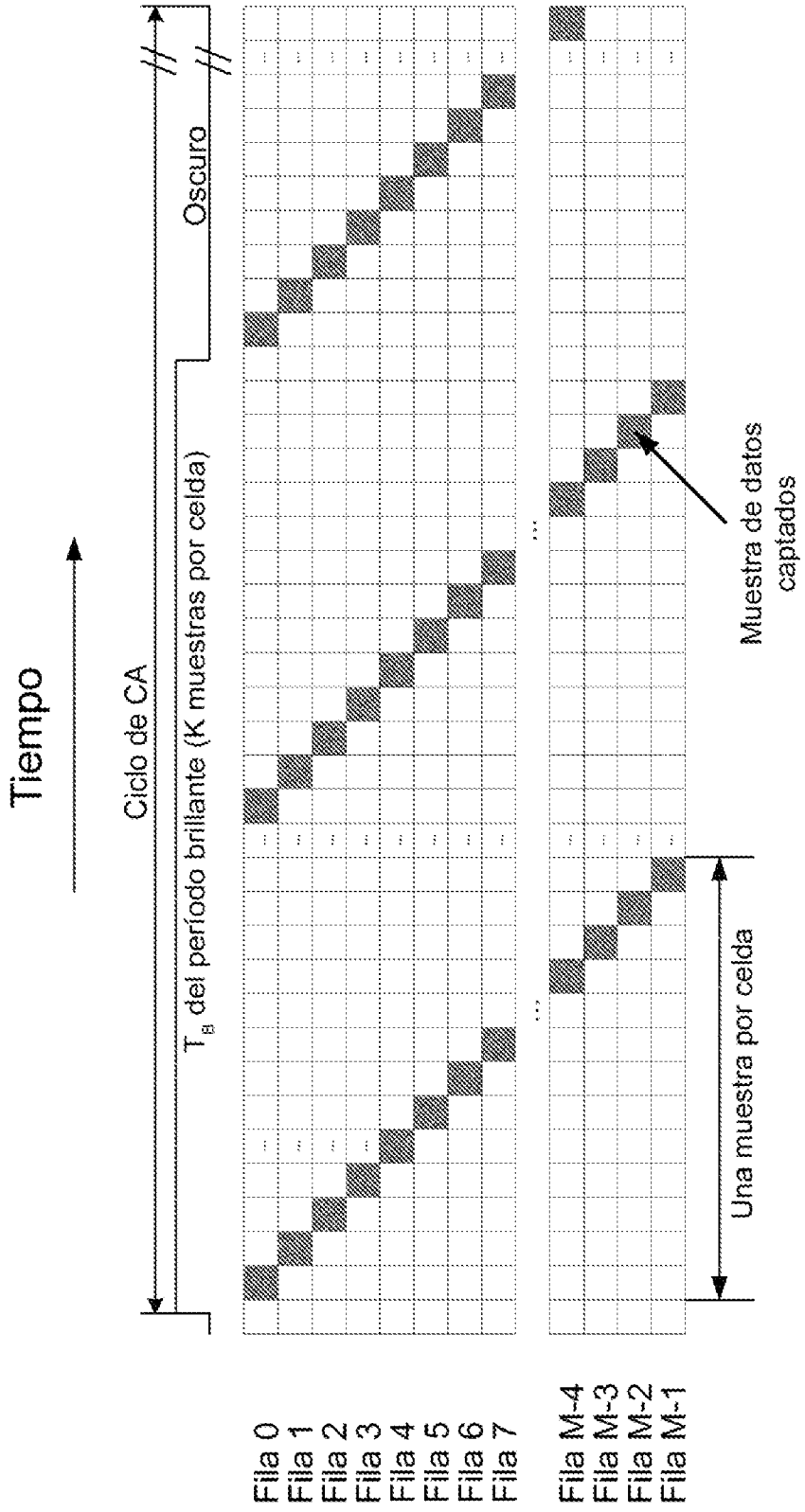

Tiempo
Ciclo de CA
Oscuro
T_B del período brillante (K muestras por celda)
Muestra de datos captados
Una muestra por celda
Fila 0
Fila 1
Fila 2
Fila 3
Fila 4
Fila 5
Fila 6
Fila 7
Fila M-4
Fila M-3
Fila M-2
Fila M-1

FIG. 9

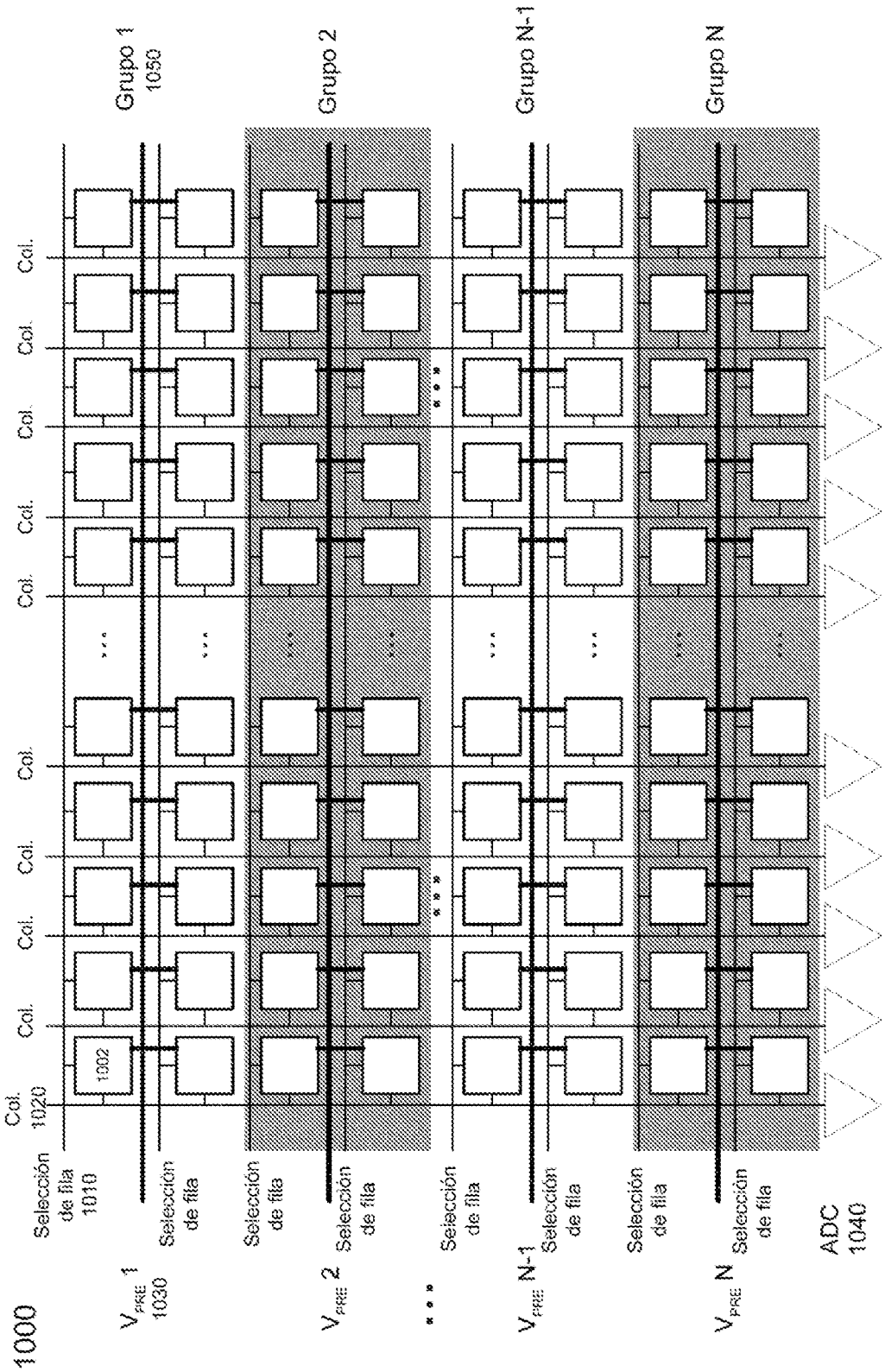

1000
Selección de fila 1010
Col. 1020
1002
Col.
Grupo 1 1050
Grupo 2
Grupo N-1
Grupo N
V_{PRE} 1 1030
V_{PRE} 2
V_{PRE} N-1
V_{PRE} N
Selección de fila
ADC 1040

FIG. 10

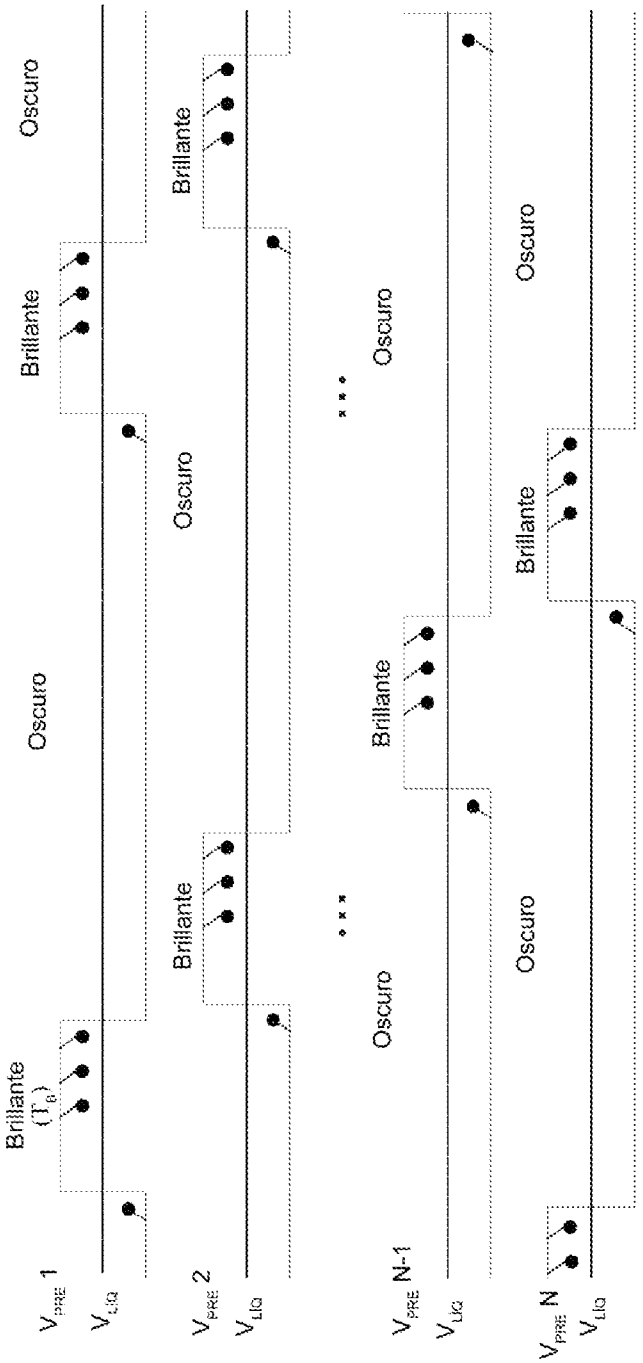

Brillante
(T_θ)
Oscuro
Brillante
Oscuro
V_{PRE} 1
V_{LIQ}
Brillante
Oscuro
Brillante
V_{PRE} 2
V_{LIQ}
Oscuro
Brillante
Oscuro
V_{PRE} N-1
V_{LIQ}
Brillante
Oscuro
V_{PRE} N
V_{LIQ}
Tiempo

FIG. 11

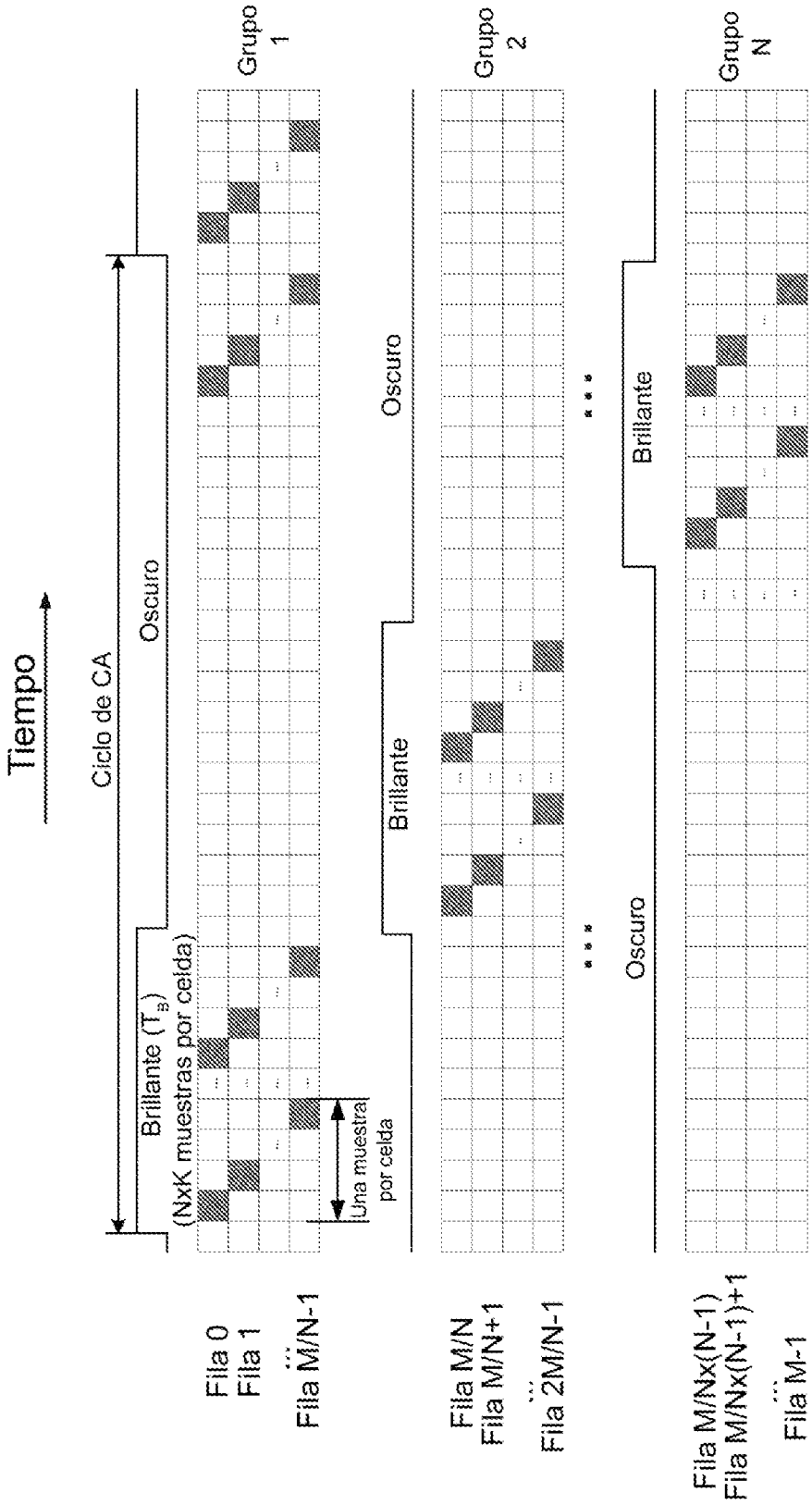

Tiempo
Ciclo de CA
Oscuro
Brillante (T_B)
(NxK muestras por celda)
Una muestra por celda
Brillante
Oscuro
Oscuro
Brillante
Grupo 1
Grupo 2
Grupo N
Fila 0
Fila 1
Fila M/N-1
Fila M/N
Fila M/N+1
Fila 2M/N-1
Fila M/Nx(N-1)
Fila M/Nx(N-1)+1
Fila M-1

FIG. 12

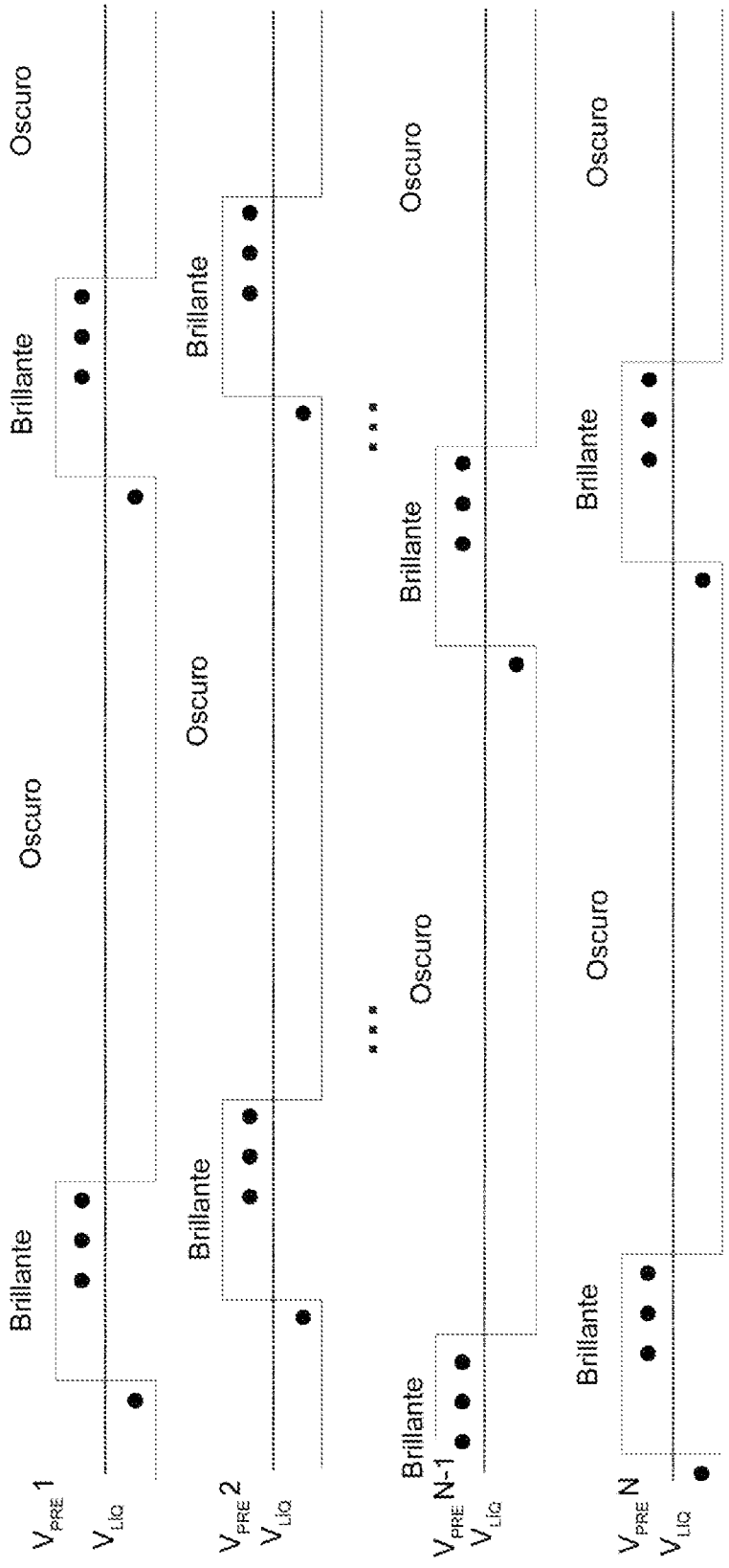

Brillante
Oscuro
Brillante
Oscuro
V_{PRE} 1
V_{LIQ}
Brillante
Oscuro
Brillante
Oscuro
V_{PRE} 2
V_{LIQ}
Brillante
Oscuro
Brillante
Oscuro
V_{PRE} N-1
V_{LIQ}
Brillante
Oscuro
Brillante
Oscuro
V_{PRE} N
V_{LIQ}
Tiempo

FIG. 13

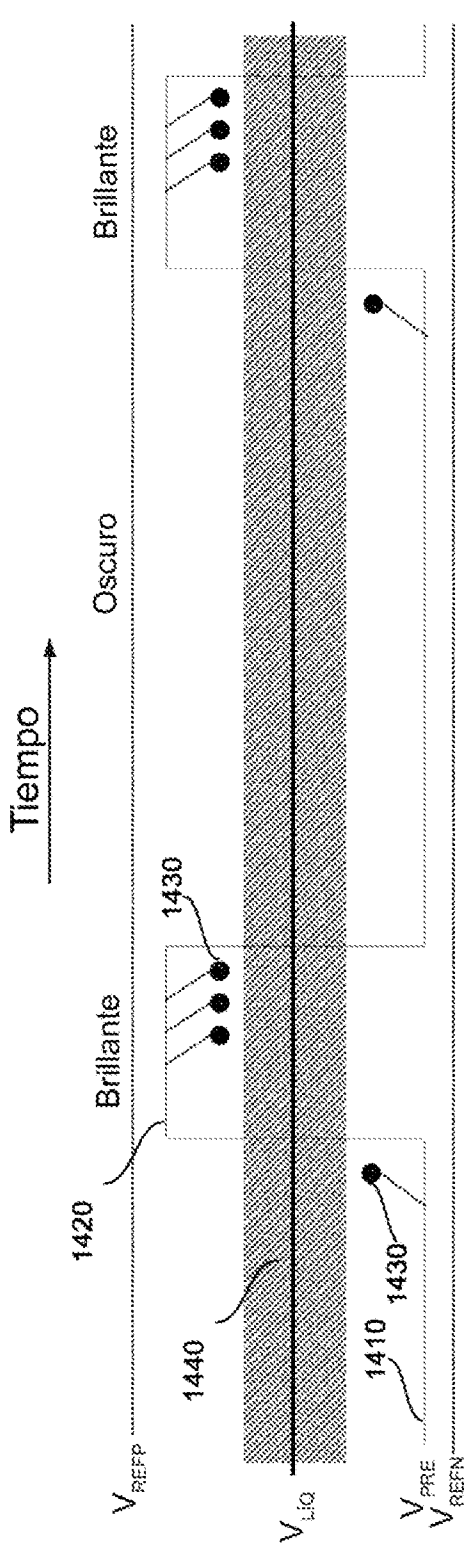


FIG. 14A

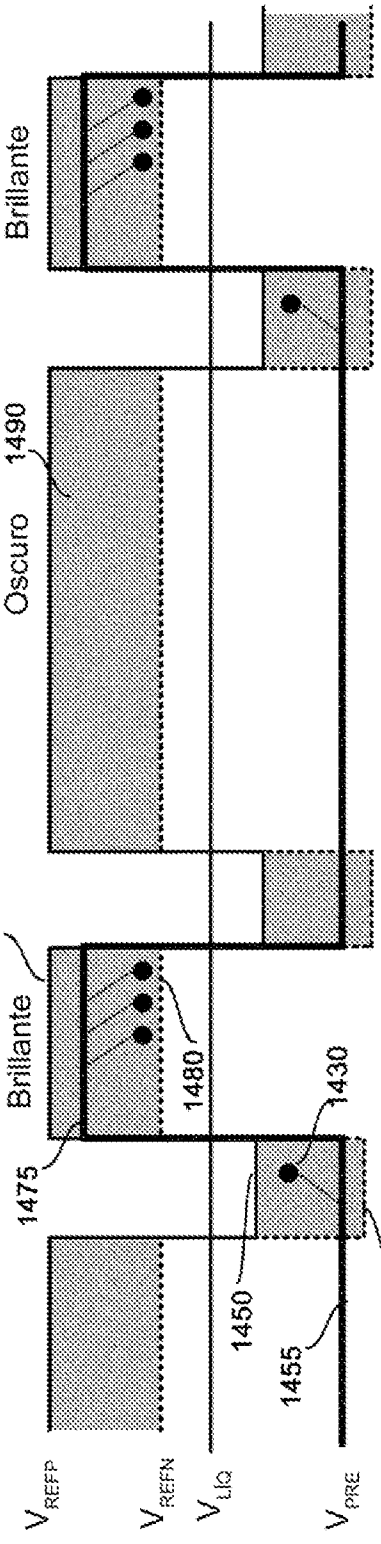


FIG. 14B

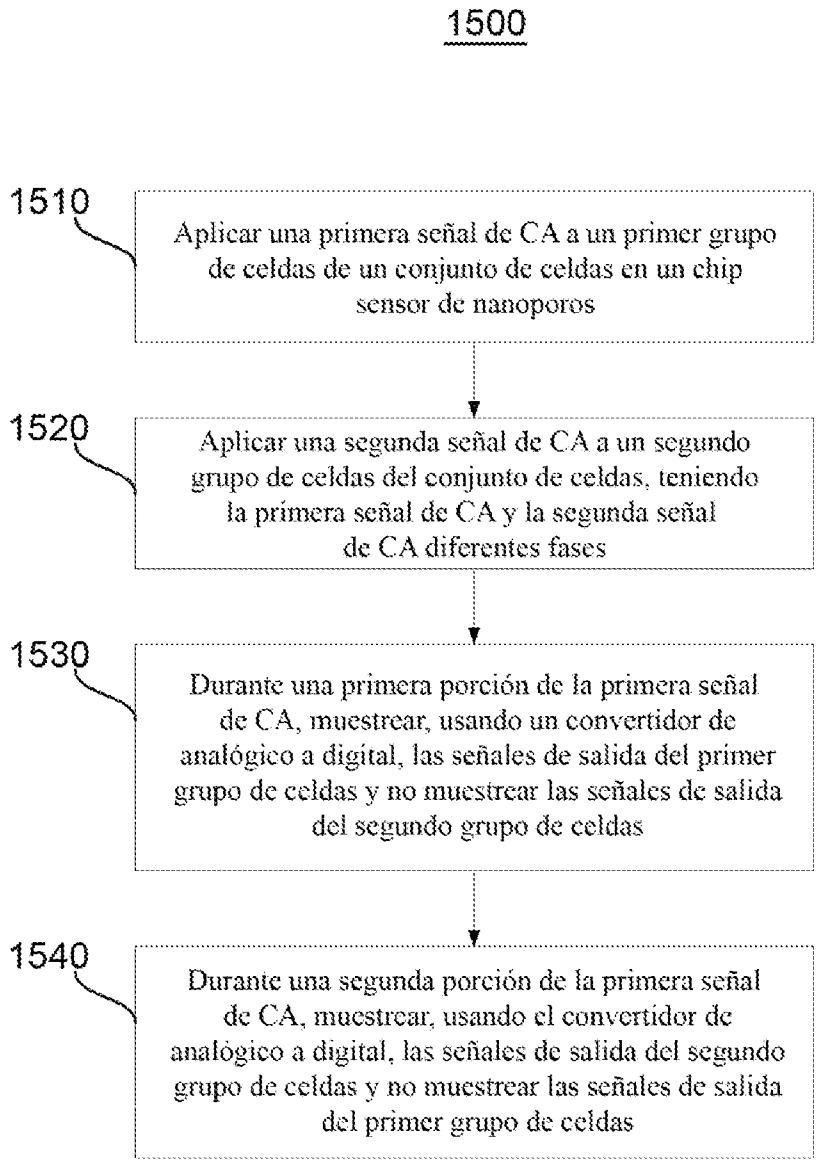

1500
1510
Aplicar una primera señal de CA a un primer grupo de celdas de un conjunto de celdas en un chip sensor de nanoporos
1520
Aplicar una segunda señal de CA a un segundo grupo de celdas del conjunto de celdas, teniendo la primera señal de CA y la segunda señal de CA diferentes fases
1530
Durante una primera porción de la primera señal de CA, muestrear, usando un convertidor de analógico a digital, las señales de salida del primer grupo de celdas y no muestrear las señales de salida del segundo grupo de celdas
1540
Durante una segunda porción de la primera señal de CA, muestrear, usando el convertidor de analógico a digital, las señales de salida del segundo grupo de celdas y no muestrear las señales de salida del primer grupo de celdas

FIG. 15

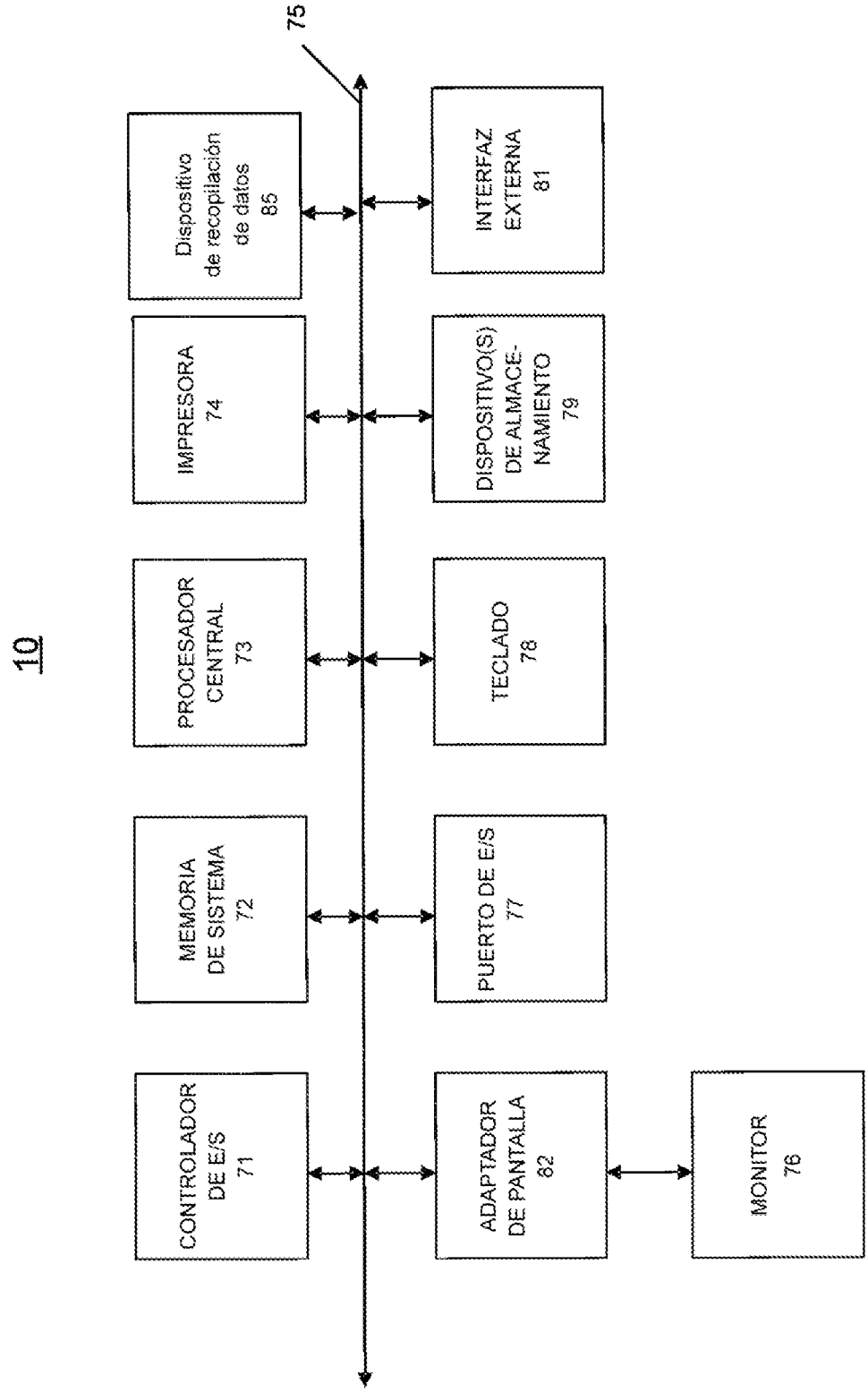

10
75
Dispositivo de recopilación de datos 85
INTERFAZ EXTERNA 81
IMPRESORA 74
DISPOSITIVO(S) DE ALMACE-NAMIENTO 79
PROCESADOR CENTRAL 73
TECLADO 78
MEMORIA DE SISTEMA 72
PUERTO DE E/S 77
CONTROLADOR DE E/S 71
ADAPTADOR DE PANTALLA 82
MONITOR 76

FIG. 16