(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 016 009**

(51) Int. Cl.:

B01D 67/00 (2006.01)
B81C 1/00 (2006.01)
C12Q 1/6869 (2008.01)
G01N 33/487 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2019 PCT/EP2019/084581**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2020 WO20120542**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2019 E 19827651 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025 EP 3894056**

(54) Título: **Sistemas y procedimientos para inserción de poros proteínicos autolimitante en una membrana**

(30) Prioridad:

11.12.2018 US 201862777976 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2025

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BARRALL, GEOFFREY;
CARMAN, GEORGE, JOHN;
HARADA, TAKESHI;
KOMADINA, JASON;
MANEY JR., J. WILLIAM y
YANG, CHARLOTTE

(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

Sistemas y procedimientos para inserción de poros proteínicos autolimitante en una membrana

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 62/777.976, presentada el martes, 11 de diciembre de 2018.

Antecedentes

Un chip de secuenciación basado en nanoporos es una herramienta analítica que se puede usar para secuenciación de ADN. Estos dispositivos pueden incorporar una gran cantidad de celdas de sensor configuradas como una matriz. Por ejemplo, un chip de secuenciación puede incluir una matriz de un millón de celdas, con, por ejemplo, 1000 filas por 1000 columnas de celdas. Cada celda de la matriz puede incluir una membrana y un poro proteínico que tiene un tamaño de poro del orden de un nanómetro de diámetro interno. Se ha demostrado que dichos nanoporos son eficaces en la secuenciación rápida de nucleótidos.

Cuando se aplica un potencial de voltaje a través de un nanoporo sumergido en un fluido conductor, puede existir una pequeña corriente iónica atribuida a la conducción de iones a través del nanoporo. El tamaño de la corriente es sensible al tamaño de poro y al tipo de molécula situada dentro del nanoporo. La molécula puede ser una marca particular fijada a un nucleótido particular, permitiendo de este modo la detección de un nucleótido en una posición particular de un ácido nucleico. Se puede medir un voltaje u otra señal en un circuito que incluye el nanoporo (por ejemplo, en un condensador integrador) como una forma de medir la resistencia de la molécula, permitiendo de este modo la detección de qué molécula está en el nanoporo.

Para que el chip de secuenciación funcione apropiadamente, en general solo se debe insertar un poro en la membrana de una celda dada. Si se insertan múltiples poros en una sola membrana, la firma eléctrica generada por los nucleótidos que pasan simultáneamente a través de los múltiples poros será mucho más difícil de interpretar.

La aplicación de voltaje a través de la membrana durante la etapa de inserción de poros puede facilitar el procedimiento de inserción de poros, posiblemente reduciendo la estabilidad de la membrana y permitiendo que el propio poro se inserte más fácilmente en la membrana. Sin embargo, la aplicación de un voltaje demasiado grande a través de la membrana puede provocar una alteración importante de la membrana que deja la celda inutilizable.

El documento WO2018/09348 divulga un aparato para controlar la inserción de un canal de membrana en una membrana, que comprende: un primer baño para mantener un primer líquido en contacto con una primera superficie de la membrana; un segundo baño para mantener un segundo líquido en contacto con una segunda superficie de la membrana, en el que la membrana separa el primer y segundo líquidos; un primer electrodo configurado para entrar en contacto con el primer líquido; un segundo electrodo configurado para entrar en contacto con el segundo líquido; y una unidad de accionamiento configurada para aplicar una diferencia de potencial a través de la membrana por medio del primer y segundo electrodo para promover la inserción de un canal de membrana en la membrana desde el primer líquido o el segundo líquido, en el que: el aparato comprende una unidad de reducción de voltaje de membrana conectada en serie con la membrana; la unidad de accionamiento se configura para aplicar un voltaje de accionamiento a través de la unidad de reducción de voltaje de membrana y la membrana, el voltaje de accionamiento proporciona la diferencia de potencial a través de la membrana; y la unidad de reducción de voltaje de membrana se configura de modo que una reducción en la resistencia a través de la membrana provocada por la inserción de un canal de membrana incrementa intrínsecamente una diferencia de potencial a través de la unidad de reducción de voltaje de membrana, reduciendo de este modo la diferencia de potencial a través de la membrana, en el que la reducción de la diferencia de potencial a través de la membrana es suficiente para prevenir o reducir la promoción de la inserción de otro canal de membrana.

RENNER STEPHAN *ET AL*. "Voltage-controlled insertion of single α-hemolysin and *Mycobacterium smegmatis* (MspA) nanopores into lipid bilayer membranes" divulga que a pH neutro y alta concentración salina, la inserción de nanoporos de α-hemolisina y MspA en membranas de bicapa lipídica depende en gran medida del potencial de membrana y su polaridad y divulga además la aplicación de rampas de voltaje entre 0 y ±250 mV para incorporar MspA en una membrana lipídica.

Por lo tanto, sería ventajoso proporcionar un sistema y procedimiento para insertar de manera fiable un solo poro en la membrana mientras se reduce el riesgo de dañar excesivamente la membrana.

Breve sumario

Diversos modos de realización proporcionan técnicas y sistemas relacionados con la inserción de un solo poro en

una membrana en una celda de un chip de secuenciación basado en nanoporos. En algunos modos de realización, la inserción de un poro en la membrana reduce la probabilidad de inserción de un poro adicional en la membrana.

La presente divulgación también se refiere a sistemas y medios legibles por ordenador asociados con procedimientos descritos en el presente documento.

La presente invención proporciona un procedimiento para formar una matriz de celdas de sensor de nanoporos. El procedimiento incluye introducir un nanoporo próximo a una celda, teniendo la celda un electrodo de trabajo y una membrana sellando la celda, en el que el electrodo de trabajo se alimenta por una fuente de energía acoplada a CA; aplicar una forma de onda de voltaje a través de la membrana de la celda, en el que la forma de onda de voltaje comienza en un primer voltaje y se incrementa en magnitud durante un período de tiempo hasta un segundo voltaje; e insertar el nanoporo en la membrana durante la etapa de aplicar la forma de onda de voltaje, en el que la forma de onda de voltaje comprende una pluralidad de etapas incrementales entre el primer voltaje y el segundo voltaje.

En algunos modos de realización, el primer voltaje está entre aproximadamente 0 y 100 mV y el segundo voltaje está entre aproximadamente 100 y 2000 mV.

En algunos modos de realización, el electrodo de trabajo es un electrodo capacitivo.

En algunos modos de realización, la pluralidad de etapas incrementales se incrementan en aproximadamente 1 a 100 mV.

En algunos modos de realización, la pluralidad de etapas incrementales se incrementan en aproximadamente 1 a 25 mV.

En algunos modos de realización, cada etapa incremental tiene una duración de entre aproximadamente 0,1 y 60 segundos.

En algunos modos de realización, la duración de las etapas incrementales es variable.

En algunos modos de realización, la duración de las etapas incrementales a voltajes menores es mayor que la duración de las etapas incrementales a voltajes mayores.

En algunos modos de realización, la duración de las etapas incrementales es constante.

En algunos modos de realización, la forma de onda de voltaje comprende una rampa entre el primer voltaje y el segundo voltaje.

En algunos modos de realización, la rampa está entre aproximadamente 0,1 a 2,0 V por minuto.

En algunos modos de realización, la rampa tiene una pendiente constante.

En algunos modos de realización, la rampa tiene una pendiente variable.

En algunos modos de realización, la rampa tiene una pendiente a voltajes menores que es menor que la pendiente a voltajes mayores.

En algunos modos de realización, la etapa de aplicar la forma de onda de voltaje se aplica a una membrana no adelgazada.

En algunos modos de realización, el procedimiento incluye además adelgazar la membrana no adelgazada con la forma de onda de voltaje aplicada.

La presente divulgación también proporciona un sistema para secuenciar una molécula. El sistema incluye una matriz de celdas sobre un sustrato, teniendo cada celda un electrodo de trabajo y una abertura configurada para sellarse por una membrana, en el que el electrodo de trabajo se alimenta por una fuente de energía acoplada a CA; un contraelectrodo; una fuente de energía, en el que la fuente de energía se acopla a CA a cada electrodo de trabajo; un controlador programado para: suministrar una forma de onda de voltaje a la celda usando el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, en el que la forma de onda de voltaje comienza en un primer voltaje y se incrementa en magnitud durante un período de tiempo hasta un segundo voltaje.

En algunos ejemplos, el electrodo de trabajo es un electrodo capacitivo.

En algunos ejemplos, la forma de onda de voltaje comprende una pluralidad de etapas incrementales entre el primer voltaje y el segundo voltaje.

En algunos ejemplos, la forma de onda de voltaje comprende una rampa entre el primer voltaje y el segundo voltaje.

En algunos ejemplos, el controlador se programa además para suministrar la forma de onda de voltaje a una membrana no adelgazada.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para formar una matriz de celdas de sensor de nanoporos. El procedimiento puede incluir introducir un nanoporo próximo a una celda, teniendo la celda un electrodo de trabajo y una membrana sellando la celda, en el que el electrodo de trabajo se alimenta por una fuente de energía acoplada eléctricamente; aplicar una forma de onda de voltaje a través de la membrana de la celda, en el que la forma de onda de voltaje comienza en un primer voltaje y se incrementa en magnitud durante un período de tiempo hasta un segundo voltaje, en el que la forma de onda de voltaje incluye una componente de modulación de CA, la componente de modulación de CA configurada para permitir que se tomen mediciones eléctricas a través del electrodo de trabajo mientras la forma de onda de voltaje se aplica a través de la membrana de la celda; e insertar el nanoporo en la membrana durante la etapa de aplicar la forma de onda de voltaje.

En algunos ejemplos, la componente de modulación de CA tiene una amplitud de menos de 100 mV. En algunos ejemplos, la componente de modulación de CA tiene una frecuencia entre 10 Hz y 1000 Hz.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para formar una celdas cubiertas de membrana. El procedimiento puede incluir hacer fluir un material formador de membrana sobre una celda, teniendo la celda un electrodo de trabajo, en el que el electrodo de trabajo se alimenta por una fuente de energía acoplada eléctricamente; disponer una capa de material formador de membrana sobre la celda; aplicar una forma de onda de voltaje a través de la capa de material formador de membrana con el electrodo de trabajo y un contraelectrodo en un lado opuesto de la capa de material formador de membrana, en el que la forma de onda de voltaje incluye una componente de modulación de CA, la componente de modulación de CA configurada para permitir que se tomen mediciones eléctricas a través del electrodo de trabajo mientras se aplica la forma de onda de voltaje a través de la capa de material formador de membrana; y adelgazar la capa de material formador de membrana en una membrana, la membrana configurada para recibir un nanoporo.

En algunos ejemplos, la componente de modulación de CA tiene una amplitud de menos de 100 mV. En algunos ejemplos, la componente de modulación de CA tiene una frecuencia entre 10 Hz y 1000 Hz.

Se puede obtener una mejor comprensión de la naturaleza y de las ventajas de los modos de realización de la presente invención con referencia a la siguiente descripción detallada y a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Los rasgos característicos novedosos de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones que siguen. Se obtendrá una mejor comprensión de los rasgos característicos y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone modos de realización ilustrativos, en los que se utilizan los principios de la invención, y con los dibujos adjuntos:

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

La FIG. 2 ilustra un modo de realización de una celda de nanoporo en un chip sensor de nanoporo 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 capturados de una celda de nanoporo durante períodos brillantes y períodos oscuros de ciclos de CA.

La FIG. 6 ilustra un modo de realización de un diagrama de circuito de una celda de sensor de nanoporo.

La FIG. 7 ilustra una forma de onda de voltaje escalonada que se puede usar para facilitar la inserción de poros.

Las FIGS. 8A y 8B ilustran una forma de onda de voltaje de rampa que se puede usar para facilitar la inserción de poros.

Las FIGS. 9A y 9B ilustran que en algunos modos de realización, una vez que se ha insertado el poro, el poro

puede disipar la acumulación de voltaje a través de la propia membrana, de este modo tanto reduciendo el riesgo de daño a la membrana cuando el voltaje se incrementa además después de que se ha insertado el poro como reduciendo la probabilidad de inserción de poros adicional.

La FIG. 10A ilustra un gráfico del número de inserciones de poros en una matriz en función del voltaje y el tiempo, y la FIG. 10B ilustra un gráfico del número de desactivaciones/cortocircuitos, que resultan de la alteración de membrana, en función del voltaje y el tiempo.

La FIG. 11 es un sistema informático, de acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación.

Términos

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica. Los procedimientos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica de las técnicas divulgadas. Los siguientes términos se proporcionan para facilitar el entendimiento de determinados términos usados con frecuencia y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación. Las abreviaturas usadas en el presente documento tienen su significado convencional dentro de las artes químicas y biológicas.

Un "*nanoporo*" se refiere a un poro, canal o paso formado o proporcionado de otro modo en una membrana. Una membrana puede ser una membrana orgánica, tal como una bicapa lipídica, o una membrana sintética, tal como una membrana formada de un material polimérico. El nanoporo se puede disponer contiguo o cercano a un circuito de detección o un electrodo acoplado a un circuito de detección, tal como, por ejemplo, un circuito con semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS) o transistor de efecto campo (FET). En algunos ejemplos, un nanoporo tiene una anchura o diámetro característico del orden de 0,1 nanómetros (nm) a aproximadamente 1000 nm. En algunas implementaciones, un nanoporo puede ser una proteína.

Un "*ácido nucleico*" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bien bicatenaria. El término engloba 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 manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamiditas, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metilribonucleótidos y ácidos peptidonucleicos (APN). A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también engloba implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se puede usar de manera intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

El término "*nucleótido*", además de referirse a los monómeros de ribonucleótido o desoxirribonucleótido naturales, se puede entender que se refiere a variantes estructurales relacionadas del mismo, incluyendo derivados y análogos, que son funcionalmente equivalentes con respecto al contexto particular en el que se usa el nucleótido (por ejemplo, hibridación a una base complementaria), a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

El término "*marca*" se refiere a un resto detectable que puede ser átomos o moléculas, o un grupo de átomos o moléculas. Una marca puede proporcionar una firma óptica, electroquímica, magnética o electrostática (por ejemplo, inductiva, capacitiva), firma que se puede detectar con la ayuda de un nanoporo. Típicamente, cuando un nucleótido se fija a la marca, se le llama "nucleótido marcado". La marca se puede fijar al nucleótido por medio del resto fosfato.

El término "*molde*" se refiere 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 refiere 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.

Una "polimerasa" se refiere a una enzima que realiza la síntesis dirigida por molde de polinucleótidos. El término engloba tanto un polipéptido de longitud completa como un dominio que tiene actividad polimerasa. Las ADN polimerasas son bien conocidas para los expertos en la técnica e incluyen pero no se limitan a, ADN polimerasas aisladas o derivadas de *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus litoralis* y *Thermotoga maritime*, o versiones

modificadas de los mismos. Incluyen tanto polimerasas dependientes de ADN como polimerasas dependientes de ARN tales como retrotranscriptasa. Son conocidas al menos cinco familias de ADN polimerasas dependientes de ADN, aunque la mayoría pertenecen a las familias A, B y C. Hay poca o ninguna similitud de secuencia entre las distintas familias. La mayoría de polimerasas de la familia A son proteínas monocatenarias que pueden contener múltiples funciones enzimáticas incluyendo actividad polimerasa, actividad exonucleasa de 3' a 5' y actividad exonucleasa de 5' a 3'. Las polimerasas de la familia B tienen típicamente un único dominio catalítico con actividad polimerasa y exonucleasa 3' a 5', así como factores accesorios. Las polimerasas de la familia C son típicamente proteínas de múltiples subunidades con actividad polimerizadora y exonucleasa 3' a 5'. En *E. coli*, se han descubierto tres tipos de ADN polimerasas: ADN polimerasas I (familia A), II (familia B) y III (familia C). En células eucariotas, tres polimerasas diferentes de la familia B (ADN polimerasas α, δ y ε) están implicadas en la replicación nuclear, y una polimerasa de la familia A (polimerasa γ) se usa para la replicación del ADN mitocondrial. Otros tipos de ADN polimerasas incluyen las polimerasas de fagos. De forma similar, las ARN polimerasas incluyen típicamente ARN polimerasas eucariotas I, II y III, y ARN polimerasas bacterianas, así como las polimerasas de fagos y víricas. Las ARN polimerasas pueden ser dependientes de ADN y dependientes de ARN.

El término "*período brillante*" en general se refiere al período de tiempo en que 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*" en general se refiere al período de tiempo en que 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.

El término "*valor de señal*" se refiere a un valor de la salida de señal de secuenciación de una celda de secuenciación. De acuerdo con determinados modos de realización, la señal de secuenciación es una señal eléctrica que se mide y/o se emite desde un punto en un circuito de una o más celdas de secuenciación, por ejemplo, el valor de señal es (o representa) un voltaje o una corriente. El valor de señal puede representar los resultados de una medición directa de voltaje y/o corriente y/o puede representar una medición indirecta, por ejemplo, el valor de la señal puede ser una duración medida del tiempo que tarda un voltaje o corriente en alcanzar un valor especificado. Un valor de señal puede representar cualquier cantidad medible que se correlaciona con la resistividad de un nanoporo y de la que se puede derivar la resistividad y/o conductancia del nanoporo (roscado y/o no roscado). Como otro ejemplo, el valor de señal puede corresponder a una intensidad de luz, por ejemplo, de un fluoróforo fijado a un nucleótido que se añade a un ácido nucleico con una polimerasa.

El término "*osmolaridad*", también conocida como concentración osmótica, se refiere a una medida de concentración de soluto. La osmolaridad mide el número de osmoles de partículas de soluto por unidad de volumen de solución. Un osmol es una medida del número de moles de soluto que contribuyen a la presión osmótica de una solución. La osmolaridad permite la medición de la presión osmótica de una solución y la determinación de cómo se difundirá el disolvente a través de una membrana semipermeable (ósmosis) que separa dos soluciones de diferente concentración osmótica.

El término "*osmolito*" se refiere a cualquier compuesto soluble que cuando se disuelve en una solución incrementa la osmolaridad de esa solución.

Descripción detallada

De acuerdo con determinados modos de realización, las técnicas y sistemas divulgados en el presente documento se relacionan con la inserción de un solo poro en una membrana en una celda de un chip de secuenciación basado en nanoporos. En algunos modos de realización, la inserción de un poro en la membrana reduce la probabilidad de inserción de un poro adicional en la membrana, autolimitando de este modo otra inserción de poros y reduciendo o eliminando la necesidad de retroalimentación activa durante la etapa de inserción.

Se describen inicialmente sistemas de nanoporos, circuitos y operaciones de secuenciación de ejemplo, seguidos de técnicas de ejemplo para reemplazar nanoporos en celdas de secuenciación de ADN.

I. Chip de secuenciación basado en nanoporos

La FIG. 1 es una vista superior de un modo de realización de un chip sensor de nanoporo 100 que tiene una matriz 140 de celdas de nanoporos 150. Cada celda de nanoporo 150 incluye un circuito de control integrado en un sustrato de silicio del chip sensor de nanoporo 100. En algunos modos de realización, se incluyen paredes laterales 136 en la matriz 140 para separar grupos de celdas de nanoporos 150 de modo que cada grupo pueda 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 nanoporo 100 incluye una placa de cubierta 130. En algunos modos de realización, el chip sensor de nanoporo 100 también incluye 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 nanoporo 100 incluye 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 nanoporo 100 se acopla a (por ejemplo, conecta 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. Estos procedimientos pueden incluir, 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. Los componentes de la estación de trabajo de nanochip pueden incluir además brazos robóticos, uno o más procesadores de ordenador y/o memoria. Se puede detectar una pluralidad de polinucleótidos en la matriz 140 de celdas de nanoporos 150. En algunos modos de realización, cada celda de nanoporo 150 se puede abordar individualmente.

II. Celda de secuenciación de nanoporos

Las celdas de nanoporos 150 en el chip sensor de nanoporo 100 se pueden implementar de muchas formas diferentes. Por ejemplo, en algunos modos de realización, se fijan 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 mueven 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 particular de la marca fijada al nucleótido. En algunas implementaciones, solo las marcas se mueven al nanoporo. También puede haber muchas formas diferentes de detectar las diferentes marcas en los nanoporos.

A. Estructura de celda de secuenciación de nanoporos

La FIG. 2 ilustra un modo de realización de una celda de nanoporo de ejemplo 200 en un chip sensor de nanoporo, tal como la celda de nanoporo 150 en el chip sensor de nanoporo 100 de la FIG. 1, que se puede usar para caracterizar un polinucleótido o 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 electrolito 206, y la cámara de muestra 215 puede contener electrolito 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. De este modo, cada celda de nanoporo de 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.

Los modos de realización adicionales de sistemas y procedimientos para la inserción de poros se describen a continuación en la sección III. En particular, estos sistemas y procedimientos describen la inserción de poros autolimitante que logra eficazmente la inserción de un solo poro en la membrana de la celda.

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. El circuito eléctrico 222 se puede acoplar además 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.

El electrodo de trabajo 202 se puede formar 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 electrolito 206 por encima del electrodo de trabajo 202. El volumen de electrolito 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 electrolito 206 tiene un espesor de aproximadamente tres micrómetros (µm).

Como también se muestra en la FIG. 2, se puede formar una membrana sobre la capa dieléctrica 204 y que abarca todo el pocillo 205. En algunos modos de realización, la membrana incluye una monocapa lipídica 218 formada sobre 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, ganglósido GM1, lisofosfatidilcolina (LPC) o cualquier combinación de los mismos. También se pueden usar otros derivados fosfolípidos, tales como derivados de ácido fosfatídico (por ejemplo, DMPA, DDPA, DSPA), derivados de fosfatidilcolina (por ejemplo, DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DOPC, POPC, DEPC), derivados de fosfatidilglicerol (por ejemplo, DMPG, DPPG, DSPG, POPG), derivados de fosfatidiletanolamina (por ejemplo, DMPE, DPPE, DSPE DOPE), derivados de fosfatidilserina (por ejemplo, DOPS), derivados de fosfolípidos de PEG (por ejemplo, fosfolípido de mPEG, fosfolípido de poliglicerina, fosfolípido funcionalizado, fosfolípido activado terminal), fosfolípidos de difitanoílo (por ejemplo, DPhPC, DOPhPC, DPhPE y DOPhPE), por ejemplo. En algunos modos de realización, la bicapa se puede formar usando materiales no basados en lípidos, tales como copolímeros de bloque anfifílicos (por ejemplo, poli(butadieno)-bloque-poli(óxido de etileno), copolímeros de dibloque de PEG, copolímeros de tribloque de PEG, copolímeros de tribloque de PPG y poloxámeros) y otros copolímeros anfifílicos, que pueden ser no iónicos o iónicos. En algunos modos de realización, la bicapa se puede formar a partir de una combinación de materiales basados en lípidos y materiales no basados en lípidos. En algunos modos de realización, los materiales de bicapa se pueden suministrar en una fase de disolvente que incluye uno o más disolventes orgánicos tales como alcanos (por ejemplo, decano, tridecano, hexadecano, etc.) y/o uno o más aceites de silicona (por ejemplo, AR-20).

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 electrolito 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 electrolito

a granel 208 al electrodo de trabajo 202. Además de los nanoporos (por ejemplo, los PNTMC) y el analito de interés, el electrolito 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 comparte entre una pluralidad de celdas de nanoporos 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 nanoporos, o al menos a todas las celdas de nanoporos dentro de una agrupación particular. El electrodo común se puede configurar para aplicar un potencial común al electrolito 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 realizan 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 nanoporos 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 de nanoporos

Las celdas de nanoporos en el chip sensor de nanoporo, tales como las celdas de nanoporos 150 en el chip sensor de nanoporo 100, pueden permitir 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 electrolito 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 asocia 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 (por ejemplo, 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 barril del nanoporo 316. La marca contenida en el barril 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" es 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 conecta al nanoporo 316, la conductancia del nanoporo 316 es 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 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 hacia 3' 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 un valor de señal (por ejemplo, voltaje o 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 aplica una señal de corriente continua (CC) a la celda de nanoporo (por ejemplo, de modo que la dirección en la que la marca se mueve 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 varía 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 de 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 400. Como se describe anteriormente, en algunos modos de realización, el circuito eléctrico 400 incluye un contraelectrodo 410 que se puede compartir entre una pluralidad de celdas de nanoporos o todas las celdas de nanoporos en un chip sensor de nanoporo y, por lo tanto, también se puede denominar electrodo común. El electrodo común se puede configurar para aplicar un potencial común al electrolito a granel (por ejemplo, electrolito a granel 208) en contacto con la bicapa lipídica (por ejemplo, bicapa lipídica 214) en las celdas de nanoporos conectándose a una fuente de voltaje $V_{LíQ}$ 420. En algunos modos de realización, se utiliza un modo no faradaico de CA para modular el voltaje $V_{LíQ}$ con una señal de CA (por ejemplo, una onda cuadrada) y aplicarla al electrolito a granel en contacto con la bicapa lipídica en la celda de nanoporo. En algunos modos de realización, $V_{LíQ}$ es una onda cuadrada con una magnitud de ±200-250 mV y una frecuencia entre, por ejemplo, 25 y 400 Hz. El electrolito a granel entre el contraelectrodo 410 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 402 (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 402 y del pocillo 205. El electrodo de trabajo 402 se puede configurar para aplicar un potencial distintivo independiente de los electrodos de trabajo en otras celdas de nanoporos.

El dispositivo de paso 406 es un interruptor 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 la línea de control 407 para permitir o no permitir 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 haya 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 chip 408 (n_{con}). El condensador integrador 408 se puede precargar usando una señal de reinicio 403 para cerrar el interruptor 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 de referencia constante con una magnitud de, por ejemplo, 900 mV. Cuando el interruptor 401 se cierra, el condensador integrador 408 se puede precargar al nivel de voltaje de referencia 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 interruptor 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 410 puede estar en un nivel mayor que el del potencial del electrodo de trabajo 402 (y el condensador integrador 408) o viceversa. Por ejemplo, durante una fase positiva de una onda cuadrada desde una 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 410 está en un nivel mayor que el potencial del electrodo de trabajo 402. 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 410 está en un nivel menor que el del potencial del electrodo de trabajo 402. 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 410 y el electrodo de trabajo 402. En otros modos de realización, la carga y la descarga se producen 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) 435, 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 435 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 435, el condensador integrador 408 se puede precargar de nuevo usando la señal de reinicio 403 para cerrar el interruptor 401, de modo que el condensador integrador 408 se conecte 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 435 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 nanoporos en diversas tramas de datos. En algunos modos de realización, el procesador digital 430 realiza un procesamiento posterior adicional, tal como la determinación de base. El procesador digital 430 se puede implementar como equipo informático (por ejemplo, en una unidad de procesamiento de gráficos (GPU), FPGA, ASIC, etc.) o como una combinación de equipo informático 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 marca está ausente del barril del nanoporo, también denominado en el presente documento estado de no paso a través 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 (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 τ = RC, donde R es la resistencia asociada con el nanoporo (es decir, resistencia R_{PORO} 428) y C es la capacidad asociada con la membrana (es decir, condensador C_{Bicapa} 426) en paralelo con R. Una constante de tiempo de la celda de nanoporo puede ser, por ejemplo, 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 ser 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 está 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 barril del nanoporo puede estar dentro del intervalo de 200 MOhm a 40 GOhm. En otros modos de realización, se omite el condensador integrador 408, ya que el voltaje que se conduce al ADC 435 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 435 en el tiempo t1 y, a continuación, se mide el voltaje de nuevo por el ADC 435 en el tiempo t2. La diferencia de voltaje es mayor cuando la pendiente del voltaje en el 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 determina 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 valor de señal, tales como mediciones de voltaje o corriente.

En algunos modos de realización, el circuito eléctrico 400 no incluye 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, se puede usar el condensador 426 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 nanoporos

Para realizar la secuenciación de un ácido nucleico, se puede muestrear el nivel de voltaje del condensador integrador (por ejemplo, el condensador integrador 408 (n_{con}) o el condensador 426 (C_{Bicapa})) y convertir por el ADC (por ejemplo, el ADC 435) mientras se añade un nucleótido marcado al ácido nucleico. La marca del nucleótido se puede empujar hacia el barril 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 barril del nanoporo. Este movimiento puede ocurrir múltiples veces durante un acontecimiento de paso. Cuando la marca está en el barril 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 (denominado 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 barril del nanoporo, el nanoporo está en modo brillante. Cuando la marca se expulsa fuera del barril 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) capturados 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 haber un subconjunto capturado cuando, por ejemplo, $V_{LÍQ}$ es menor que V_{PRE}, que puede corresponder a un modo (período) brillante cuando la marca se fuerza hacia el barril del nanoporo. Otro subconjunto puede corresponder a un modo (período) oscuro cuando la marca se empuja fuera del barril 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 interruptor 401, el voltaje en el condensador integrador (por ejemplo, el condensador integrador 408 (n_{con}) o el condensador 426 (C_{Bicapa})) cambiará de manera 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 nucleótidos marcados) en el nanoporo. El nivel de voltaje se puede medir en un tiempo predeterminado después de que se abre el interruptor 401.

El interruptor 401 puede funcionar a la tasa de adquisición de datos. El interruptor 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 interruptor permite recopilar múltiples puntos de datos durante cada subperíodo (brillante u oscuro) de cada ciclo de CA de $V_{LÍQ}$. Si el interruptor 401 permanece abierto, el nivel de voltaje en el condensador integrador y, por tanto, el valor de salida del ADC, cae completamente y permanece allí. Si en cambio se cierra el interruptor 401, el condensador integrador se precarga de nuevo (a V_{PRE}) y queda listo para otra medición. Por tanto, el interruptor 401 permite recopilar múltiples puntos de datos para cada subperíodo (brillante u oscuro) de cada ciclo de CA. Dichas múltiples mediciones pueden permitir 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 que pasa a través del 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 capturados 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 nanoporos 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 barril 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 flujo de los iones). Cuando se abre el interruptor 401, el voltaje en un nodo antes del ADC (por ejemplo, en un condensador integrador) disminuirá. Después de capturar un punto de datos de voltaje (por ejemplo, después de un período de tiempo especificado), se puede cerrar el interruptor 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 capturar 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 de $V_{LÍQ}$ puede ser menor que los puntos de datos posteriores 524. Esto se puede deber a que no hay 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 superar el nivel de $V_{LÍQ}$ como se muestra en la FIG. 5. Esto puede estar provocado por la capacidad de la bicapa que acopla la señal al condensador en el chip. Los puntos de datos 524 se pueden capturar después de que se haya producido un acontecimiento de paso, es decir, se fuerza una marca hacia el barril del nanoporo, donde la resistencia del nanoporo y, por tanto, la tasa de descarga del condensador integrador dependen del tipo particular de marca que se fuerza hacia el barril 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 barril del nanoporo. Cuando se abre el interruptor 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 capturar un punto de datos de voltaje (por ejemplo, después de un período de tiempo especificado), el interruptor 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 capturar múltiples puntos de datos durante el período oscuro, incluyendo un primer punto delta 532 y puntos de datos posteriores 534. Como se describe anteriormente, durante el período oscuro, cualquier marca de nucleótido se expulsa fuera del nanoporo y, por tanto, se obtiene una información mínima sobre cualquier marca de nucleótido, además de para su uso en la normalización.

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 capturados, incluyendo un primer punto de datos 542 y puntos de datos posteriores 544, 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 mover, 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.

Se pueden encontrar otros detalles con respecto a las mediciones 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".

4. Normalización y llamada de bases

Para cada celda de nanoporo utilizable del chip sensor de nanoporo, se puede realizar un modo de producción para secuenciar ácidos nucleicos. Los datos de salida de ADC capturados durante la secuenciación se pueden normalizar para proporcionar una mayor exactitud. La normalización puede tener en cuenta efectos de desviación, tales como conformación de ciclo, variaciones de ganancia, desviación de inyección de carga y desviación de valor de referencia. En algunas implementaciones, los valores de señal de un ciclo de período brillante correspondiente a un acontecimiento de paso se pueden aplanar de modo que se obtenga un único valor de señal para el ciclo (por ejemplo, un promedio) o se pueden realizar ajustes a la señal medida para reducir la caída intraciclo (un tipo de efecto de conformación de ciclo). Las variaciones de ganancia, en general, escalan toda la señal y cambian en el orden de 100s a 1000s de segundos. Como ejemplo, las variaciones de ganancia se pueden desencadenar por cambios en la solución (resistencia de poro) o cambios en la capacidad de bicapa. La desviación de valor de referencia se produce en una escala de tiempo de ~100 ms y se refiere a una desviación de voltaje en el electrodo de trabajo. La desviación de valor de referencia puede estar impulsada por cambios en una proporción de rectificación eficaz a partir del paso como resultado de la necesidad de mantener el equilibrio de carga en la celda de secuenciación desde el período brillante hasta el período oscuro.

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).

III. INSERCIÓN DE POROS AUTOLIMITANTE

Después de que se inserta un poro en la membrana de una celda, el voltaje a través de la membrana comienza a caer rápidamente debido a la conductancia relativamente alta del poro. La disminución en el voltaje a través de la membrana reduce la fuerza impulsora para la inserción de poros adicional en la membrana.

La FIG. 6 ilustra un modo de realización de un diagrama de circuito 600 para una celda de sensor de nanoporo que resalta algunos de los diversos voltajes y componentes de la celda de sensor que pueden ser pertinentes para los sistemas y procedimientos descritos en el presente documento, tales como el voltaje (Vap) 602 que se aplica entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, el voltaje (Vbc) 604 a través de la bicapa, el voltaje (Vpre) 606 que se usa para precargar el electrodo de trabajo (Cdoblecapa) 608 y el condensador de integración (NCON) 610, y el voltaje (Vlíq) 612 que se aplica al contraelectrodo.

En el presente documento se describen procedimientos y sistemas que aprovechan esta propiedad para insertar poros proteínicos y controlar la inserción de un solo poro sin retroalimentación activa durante la etapa de inserción. En algunos modos de realización de este procedimiento de inserción de poros, se aplica un voltaje acoplado a CA por medio de electrodos de trabajo capacitivos, y el voltaje se mantiene a través de la membrana por la baja conductancia de la membrana sin poros. En algunos modos de realización, el voltaje se puede aplicar a toda la matriz de celdas, independientemente del estado actual de inserción de poros. En algunos modos de realización, el voltaje se puede aplicar a celdas que tienen una membrana. La forma de onda de voltaje que se aplica se puede incrementar gradualmente como una rampa, como una pluralidad de etapas crecientes u otras conformaciones diseñadas para producir una baja probabilidad de inserción de poros proteínicos adicional mientras se reduce también el riesgo de daño de membrana. Esto se puede lograr limitando los transitorios de aplicación de voltaje usando pequeñas etapas de voltaje, tasas modestas de incremento de voltaje en una rampa de voltaje o similares.

Por ejemplo, en algunos modos de realización como se muestra en la FIG. 7, el voltaje de inserción de poros (Vap) se puede aplicar como una forma de onda de voltaje escalonada 700 que comienza en 0 mV y se incrementa en incrementos de 100 mV cada 5 segundos hasta un voltaje máximo de 600 mV. En algunos modos de realización, el voltaje inicial puede ser de aproximadamente 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mV. En algunos modos de realización, el incremento de etapa puede ser de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300 mV. En algunos modos de realización, la duración de cada etapa puede ser de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 60 segundos. En algunos modos de realización, las etapas pueden tener una duración variable. Por ejemplo, en algunos modos de realización, algunas o todas las etapas en los voltajes menores pueden tener una duración más larga que las etapas en los voltajes mayores. En algunos modos de realización, el voltaje máximo es de aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 mV. En algunos modos de realización, se pueden predeterminar uno o más elementos de la forma de onda del voltaje de inserción de poros, tales como el voltaje de arranque inicial, la magnitud del incremento de etapa de voltaje, la duración de cada etapa y/o el voltaje máximo.

En algunos modos de realización como se muestra en la FIG. 8A, el voltaje de inserción de poros se puede aplicar como una forma de onda de voltaje en rampa 800 que comienza en 0 mV y se incrementa a una tasa de 1 V por minuto hasta un voltaje máximo de 600 mV. En algunos modos de realización, el voltaje inicial puede ser de aproximadamente 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mV. En algunos modos de realización, la tasa de incremento de voltaje es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0 V por minuto. En algunos modos de realización, el voltaje máximo es de aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 mV. En algunos modos de realización, se pueden predeterminar uno o más elementos de la forma de onda del voltaje de inserción de poros, tales como el voltaje de arranque inicial, la tasa de incremento de voltaje y/o el voltaje máximo.

En algunos modos de realización, uno o más elementos de la forma de onda del voltaje de inserción de poros se pueden determinar en base a propiedades eléctricas y/o físicas medidas de componentes de la celda, tales como resistencia de sello de membrana, que es la resistencia a través de la membrana después de que forma un sello a través de una celda. En algunos modos de realización, estas mediciones se pueden tomar antes de que se aplique la forma de onda de voltaje de modo que la forma de onda se determina completamente antes de aplicarse, a diferencia de un procedimiento basado en retroalimentación activa que usa mediciones tomadas durante la estimulación para alterar uno o más parámetros de estimulación. Debido a que los procedimientos de poración descritos en el presente documento son autolimitantes, no hay necesidad de utilizar procedimientos de poración activa que implican medir un cambio en una propiedad eléctrica o física del sistema o componente del sistema que resulta de la inserción de poro en la membrana, y a continuación ajustar el voltaje de poración en respuesta para prevenir la inserción de un segundo poro en la membrana.

En algunos modos de realización, los procedimientos descritos en el presente documento se pueden aplicar a una matriz de sensores con electrodos capacitivos en la base de micropocillos con membranas suspendidas y un contraelectrodo en el otro lado de la membrana. Los sensores se pueden usar para detectar la presencia de un poro después de que se retire la aplicación de voltaje de accionamiento de inserción de todas las celdas. Aunque

es posible detectar la presencia de un poro durante la aplicación de voltaje, no es necesario en este procedimiento y los poros se pueden insertar sin retroalimentación a la aplicación de voltaje en cualquier sensor individual en la matriz o en conjunto.

El procedimiento escanea eficazmente los voltajes necesarios para superar la barrera de activación de inserción de poros, que puede variar entre membranas individuales en la matriz, entre regiones pequeñas o grandes en la matriz, o entre una matriz de un dispositivo a otra matriz de un segundo dispositivo. Además, el voltaje de poración puede variar entre mutantes de poro, entre composiciones de membrana y conformaciones que incluyen bicapas lipídicas, copolímeros en bloque u otras implementaciones. Al escanear o barrer los voltajes en un intervalo bajo a alto, una única forma de onda de voltaje puede ser lo suficientemente robusta como para funcionar eficazmente en una gran cantidad de diferentes tipos de matrices de poros o matrices de poros del mismo tipo con una determinada cantidad de variabilidad.

Además, al pasar de un voltaje bajo a uno alto, es más probable que se inserten poros en la membrana antes de que la bicapa alcance un nivel de voltaje crítico que dañe la membrana. Además, como se muestra en las FIGS. 9A y 9B, una vez que se ha insertado el poro, el poro puede disipar la acumulación de voltaje a través de la membrana, de este modo tanto reduciendo el riesgo de daño a la membrana cuando el voltaje se incrementa además después de que se ha insertado el poro como reduciendo la probabilidad de inserción de poros adicional. Siempre que la magnitud de las etapas de voltaje o la tasa de incremento de la rampa de voltaje no sea demasiado grande, el poro puede disipar eficazmente la acumulación excesiva de voltaje a través de la membrana, reduciendo de este modo el riesgo de dañar la membrana y reduciendo la probabilidad de inserción de poros adicional. Por otra parte, sería deseable incrementar la magnitud de las etapas de voltaje o incrementar la tasa de incremento de la rampa de voltaje para reducir el tiempo que lleva completar la etapa de poración.

En algunos modos de realización, el límite superior de la forma de onda de voltaje se puede determinar comparando la cinética y/o probabilidad de inserción de poros en función del voltaje y el tiempo con la cinética y/o probabilidad de daño de membrana en función del voltaje y el tiempo. Por ejemplo, la FIG. 10A ilustra un gráfico del número de inserciones de poros en una matriz en función del voltaje, y la FIG. 10B ilustra un gráfico del número de desactivaciones/cortocircuitos, que típicamente resultan de la alteración y daño de membrana, en función del voltaje. A partir de estos dos gráficos, se puede determinar un voltaje máximo óptimo que equilibra un alto número de inserciones de poros con un bajo número de desactivaciones/cortocircuitos.

En algunos modos de realización, la concentración de poros en la solución durante la etapa de inserción de poros se selecciona para que ser lo suficientemente baja para reducir la inserción pasiva de poros en las membranas, pero todavía lo suficientemente alta para permitir la inserción asistida por voltaje de los poros en las membranas. La inserción pasiva de poros se refiere a la inserción de poros en la membrana sin la aplicación de voltaje a través de la membrana para ayudar en la inserción de poros. En algunos modos de realización, el porcentaje de poros insertados a través de inserción pasiva es menor de un 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 %, y el porcentaje de poros insertados a través de inserción asistida por voltaje es al menos de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. Reducir la tasa de inserción de poros pasiva puede reducir la probabilidad de que se inserten múltiples poros en una sola membrana.

En algunos modos de realización, la corriente de fuga puede provocar una acumulación de voltaje en una o más celdas de la matriz una vez que se coloca una membrana sobre las celdas. Esta carga atrapada puede variar en magnitud con el tiempo y entre celdas, lo que dificulta la aplicación de un voltaje uniforme en todas las membranas de las celdas cuando se induce la poración. Por ejemplo, aplicar un voltaje uniforme (Vap) a todas las celdas cuando están presentes cantidades variables de carga atrapada en las celdas en la matriz puede dar como resultado que las celdas experimenten diferentes cantidades de voltaje eficaz durante la etapa de poración, lo que puede dar lugar a altos niveles de variabilidad en el número de celdas con inserción de un solo poro y/o cantidades excesivas de voltaje que se aplican en algunas celdas, lo que puede provocar daño a la membrana. El uso de una forma de onda de voltaje escalonada o en rampa puede resolver estos problemas.

En algunos modos de realización, la formación de la membrana sobre la abertura de la celda se logra haciendo fluir un solvente y material de membrana, tal como un lípido o copolímero en bloque, sobre la abertura de la celda. A continuación, si se usa un lípido, por ejemplo, la membrana se puede adelgazar hasta una bicapa aplicando un voltaje a través de la membrana, como se describe además en la publicación de patente de EE. UU. n.° 20170283867A1, y/o manipulando el desequilibrio de osmolaridad a través de la membrana como se describe además en la publicación de patente internacional n.° WO2018001925. Como se describe en el presente documento, una membrana adelgazada es una membrana que se adelgaza suficientemente (es decir, espesor menor que la longitud de poro, por ejemplo) de modo que un poro se puede insertar en la membrana, mientras que una membrana no adelgazada es una membrana que tiene un espesor que es demasiado grande (es decir, un espesor mayor que la longitud de poro, por ejemplo) para permitir la inserción del poro. En algunos modos de realización, la formación de la membrana adelgazada (es decir, bicapas lipídicas) sobre las celdas en la matriz se puede completar antes de iniciar el procedimiento de poración e insertar los poros en las membranas. En otros modos de realización, el procedimiento de adelgazar la membrana se puede combinar con el procedimiento de insertar el poro en la membrana, por ejemplo, usando la misma forma de onda de voltaje, tal como cualquiera de las

formas de onda de voltaje descritas en el presente documento, tanto para el procedimiento de adelgazamiento como para el procedimiento de poración, y el complejo de poros se puede hacer fluir sobre la membrana durante el procedimiento de adelgazamiento y poración combinado. En algunos modos de realización, el procedimiento de adelgazamiento y poración combinado se puede aplicar después de que el material de membrana ya se haya distribuido sobre las celdas y se hayan formado membranas no adelgazadas a lo largo de las celdas en la matriz porque la aplicación de voltaje durante la distribución de material de membrana y la formación de la membrana no adelgazada inicial puede atrapar carga de manera desigual. Además, durante el procedimiento de adelgazamiento y poración combinado se puede establecer un desequilibrio osmótico a través de la membrana. Combinar las etapas de adelgazamiento y poración puede reducir sustancialmente el tiempo que lleva preparar los sensores de poro en la matriz, mejorando de este modo el rendimiento del sistema de matriz de sensor.

Los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan numerosos beneficios, incluyendo mejorar la tasa de inserción exitosa de un solo poro, reducir la tasa de inserciones de múltiples poros y reducir la probabilidad de dañar la membrana.

IV. MODULACIÓN DE CA DE LA FORMA DE ONDA DE VOLTAJE

En algunos modos de realización, como se muestra en la FIG. 7, la forma de onda de inserción de poros 700 puede ser una forma de onda de voltaje con modulación de CA. Como se muestra, la forma de onda de inserción de poros 702 se escalona, y la componente de modulación de CA 702 se puede superponer sobre la forma de onda de voltaje 700 para proporcionar fluctuaciones de voltaje rápidas en cada voltaje escalonado. Las fluctuaciones o cambios de voltaje permiten que se tomen mediciones eléctricas mientras se aplica la forma de onda de inserción de poros 700 durante la etapa de electroporación durante la inserción de poros. Estas mediciones eléctricas se pueden usar para comprobar la integridad de membrana (es decir, detectar fallo de membrana como una condición de cortocircuito), fugas de membrana (es decir, resistencia y/o conductancia de membrana), inserción de un poro y, en general, se pueden usar para monitorizar el progreso de la etapa de electroporación. En algunos modos de realización, no se pueden tomar mediciones mientras se aplica la forma de onda de voltaje y, en esos modos de realización, las mediciones en general se toman antes, después o entre aplicaciones de las formas de onda de voltaje. Superponer la componente de modulación de CA a una forma de onda de voltaje permite la aplicación simultánea de la forma de onda de voltaje y la toma de mediciones.

En algunos modos de realización, otras formas de onda de voltaje también se pueden superponer con una componente de modulación de CA. Por ejemplo, una forma de onda de formación de membrana se puede modular en CA para permitir que se tomen mediciones eléctricas mientras se aplica la forma de onda de formación de membrana durante la etapa de formación de la membrana sobre el pocillo. Estas mediciones eléctricas se pueden usar para ver si el pocillo se cubre con un material formador de membrana (es decir, comprobar una condición de cortocircuito), comprobar la integridad de membrana (es decir, detectar fallo de membrana como una condición de cortocircuito), fugas de membrana (es decir, resistencia y/o conductancia de membrana), si la membrana es de un espesor adecuado para la inserción de poros y, en general, se pueden usar para monitorizar el progreso de la etapa de formación de membrana.

En algunos modos de realización, otra forma de onda de voltaje que se puede modular en CA es una forma de onda de voltaje de translocación que se puede usar para translocar una molécula a través del poro.

En algunos modos de realización, la amplitud de la componente de modulación de CA se puede minimizar para reducir el efecto de la componente de modulación de CA en la función principal de la forma de onda de voltaje (es decir, formación de membrana o inserción de poros), mientras todavía se permite que se obtengan mediciones exactas. Una componente de modulación de CA de amplitud relativamente grande puede someter significativamente la membrana a voltajes transitorios mayores que los esperados durante la etapa de formación de membrana y/o la etapa de inserción de poros, lo que puede dar como resultado fallo de membrana o multiporación, por ejemplo. Por lo tanto, en algunos modos de realización, la amplitud de la componente de modulación de CA puede ser menor que 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 mV. En algunos modos de realización, la amplitud de la componente de modulación de CA puede ser menor que un 50, 40, 30, 20 o 10 % de la amplitud de la forma de onda de voltaje que se está modulando. En otros modos de realización, la amplitud de la componente de modulación de CA puede escalar con la amplitud de la forma de onda de voltaje que se está modulando.

En algunos modos de realización, la frecuencia de la componente de modulación de CA se puede minimizar mientras todavía se permite realizar mediciones exactas. En algunos modos de realización, la frecuencia de la modulación de CA puede ser menor que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1 veces la frecuencia máxima de muestreo. En algunos modos de realización, la frecuencia es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 Hz. En algunos modos de realización, la frecuencia es menor que 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 Hz. En algunos modos de realización, la frecuencia está entre 10 a 1000 Hz, o de 25 a 750 Hz, o de 50 a 500 Hz.

La FIG. 8B ilustra un modo de realización de la forma de onda de poración autolimitante que se muestra en la FIG. 8A con la adición de una componente de modulación de CA 802 para realizar mediciones. En este modo de realización, la amplitud de la componente de modulación de CA es de 100 mV y se muestra como el espesor de la línea en el gráfico.

Cualquier otra forma de onda de voltaje se puede superponer con una componente de modulación de CA para permitir que se tomen mediciones mientras se aplica la forma de onda de voltaje.

V. SISTEMA INFORMÁTICO

Cualquiera de los sistemas informáticos mencionados en el presente documento puede utilizar cualquier número adecuado de subsistemas, de los que muchos pueden ser opcionales. Los ejemplos de dichos subsistemas se muestran en la FIG. 11 en el sistema informático 1110. 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 incluye 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. 11 se interconectan por medio de un bus de sistema 1180. Se muestran subsistemas adicionales tales como una impresora 1174, teclado 1178, dispositivo(s) de almacenamiento 1179, monitor 1176, que se acopla al adaptador de pantalla 1182, y otros. Los periféricos y dispositivos de entrada/salida (E/S), que se acoplan al controlador de E/S 1171, se pueden conectar al sistema informático por cualquier número de medios conocidos en la técnica tales como el puerto E/S 1177 (por ejemplo, USB, FireWire®). Por ejemplo, se puede usar el puerto de E/S 1177 o interfaz externa 1181 (por ejemplo, Ethernet, wifi, etc.) para conectar el sistema informático 1110 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 1180 permite que el procesador central 1173 se comunique con cada subsistema y controle la ejecución de una pluralidad de instrucciones desde la memoria de sistema 1172 o el/los dispositivo(s) de almacenamiento 1179 (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 1172 y/o el/los dispositivo(s) de almacenamiento 1179 pueden incorporar un medio legible por ordenador. Otro subsistema es un dispositivo de recopilación de datos 1175, tal como una cámara, micrófono, acelerómetro u otro sensor y similares. Cualquiera de los datos mencionados en el presente documento se puede enviar de 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 conjuntamente por una interfaz externa 1181, 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, subsistemas o aparatos informáticos se comunican a través de 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 circuitos de *hardware* (por ejemplo, un APSIC o FPGA) y/o usando *software* de ordenador con un procesador en general programable de manera modular o integrada. Como se usa en el presente documento, un procesador puede incluir un procesador de un solo núcleo, un procesador de múltiples núcleos en un mismo chip integrado o múltiples unidades de procesamiento en una sola placa de circuito o en red, así como *hardware* dedicado. En base a la divulgación y las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, un experto en la técnica conocerá y apreciará otras formas y/o procedimientos para implementar los modos de realización de la presente invención usando *hardware* y una combinación de *hardware* y *software*.

Cualquiera de los componentes o funciones de *software* descritos en esta solicitud se puede implementar como código de *software* 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 *software* 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 cableadas, ópticas y/o inalámbricas que se ajustan 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 empaquetar con un dispositivo compatible o 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 incluye uno o más procesadores, que se pueden configurar para realizar las etapas. Por tanto, los modos de realización se pueden referir a sistemas informáticos configurados para realizar las etapas de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, potencialmente con diferentes componentes que realizan una respectiva etapa o un respectivo grupo de etapas. Aunque se presentan como etapas numeradas, las etapas de los procedimientos en el presente documento se pueden realizar al mismo tiempo o en tiempos diferentes o en un orden diferente. Adicionalmente, partes de estas etapas se pueden usar con partes de otras etapas de otros procedimientos. Además, todas o partes de un etapa pueden ser opcionales. Adicionalmente, cualquiera de las etapas de cualquiera de los procedimientos se puede realizar con módulos, unidades, circuitos u otros medios de un sistema para realizar estas etapas.

Los detalles específicos de modos de realización particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada sin alejarse 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.

Aunque los modos de realización anteriores se han descrito con cierto detalle para propósitos de claridad de comprensión, la invención no se limita a los detalles proporcionados. Existen muchas formas alternativas de implementar la invención. Los modos de realización divulgados son ilustrativos y no restrictivos. 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.

Cuando en el presente documento se hace referencia a un rasgo característico o elemento como si estuviera "sobre" otro rasgo característico o elemento, puede estar directamente sobre el otro rasgo característico o elemento o también pueden estar presentes rasgos característicos y/o elementos intermedios. Por el contrario, cuando se hace referencia a un rasgo característico o elemento como si estuviera "directamente sobre" otro rasgo característico o elemento, no existen rasgos característicos o elementos intermedios presentes. También se entenderá que, cuando se hace referencia a un rasgo característico o elemento como "conectado", "fijado" o "acoplado" a otro rasgo característico o elemento, se puede conectar, fijar o acoplar directamente al otro rasgo característico o elemento o pueden estar presentes rasgos característicos o elementos intermedios. Por el contrario, cuando se hace referencia a un rasgo característico o elemento como "directamente conectado", "directamente fijado" o "directamente acoplado" a otro rasgo característico o elemento, no existen rasgos característicos o elementos intermedios presentes. Aunque se describen o muestran con respecto a un modo de realización, los rasgos característicos y elementos así descritos o mostrados se pueden aplicar a otros modos de realización. También se apreciará por los expertos en la técnica que las referencias a una estructura o rasgo característico que se dispone "contiguo" a otro rasgo característico pueden tener partes que se superponen o se encuentran debajo del rasgo característico contiguo.

La terminología usada en el presente documento es para el propósito solo de describir modos de realización particulares y no pretende ser limitante de la invención. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el/la" pretenden incluir las formas en plural, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Se entenderá además que los términos "comprende" y/o "que comprende", cuando se usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de rasgos característicos, etapas, operaciones, elementos y/o componentes establecidos, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otros rasgos característicos, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "y/o" incluye todas y cada una de las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados y se puede abreviar como “/".

Los términos espacialmente relativos, como "debajo", "por debajo", "inferior", "encima", "superior" y similares, se pueden usar en el presente documento para facilitar la descripción para describir la relación de un elemento o rasgo característico con otro(s) elemento(s) o rasgo(s) característico(s), como se ilustra en las figuras. Se entenderá que los términos espacialmente relativos pretenden englobar diferentes orientaciones del dispositivo en uso o funcionamiento, además de la orientación representada en las figuras. Por ejemplo, si un dispositivo en las figuras está invertido, los elementos descritos como "debajo" o "por debajo" de otros elementos o rasgos característicos estarían orientados entonces "sobre" los otros elementos o rasgos característicos. Por tanto, el término ejemplar "bajo" puede englobar tanto una orientación de encima como de debajo. El dispositivo se puede orientar de otro modo (rotar 90 grados o en otras orientaciones) y los descriptores espacialmente relativos usados en el presente documento se pueden interpretar en consecuencia. De forma similar, los términos "hacia arriba", "hacia abajo", "vertical", "horizontal" y similares se usan en el presente documento solo con el propósito de

explicación a menos que se indique específicamente de otro modo.

Aunque los términos "primero" y "segundo" se pueden usar en el presente documento para describir varios rasgos característicos/elementos (incluyendo etapas), estos rasgos característicos/elementos no se deben limitar por estos términos, a menos que el contexto lo indique de otro modo. Estos términos se pueden usar para distinguir un rasgo característico/elemento de otro rasgo característico/elemento. Por tanto, un primer rasgo característico/elemento analizado a continuación se podría denominar un segundo rasgo característico/elemento, y de forma similar, un segundo rasgo característico/elemento analizado a continuación se podría denominar un primero rasgo característico/elemento sin apartarse de las enseñanzas de la presente invención.

En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "comprendiendo" quieren decir que diversos componentes se pueden emplear conjuntamente en los procedimientos y artículos (por ejemplo, composiciones y aparatos incluyendo dispositivos y procedimientos). Por ejemplo, el término "comprendiendo" se entenderá que implica la inclusión de cualquier elemento o etapa establecido, pero no la exclusión de ningún otro elemento o etapa.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluyendo como se usa en los ejemplos y a menos que se especifique expresamente de otro modo, todos los números se pueden leer como si estuvieran precedidos por la palabra "aproximadamente", incluso si el término no aparece expresamente. La frase "aproximadamente" se puede usar cuando se describe la magnitud y/o posición para indicar que el valor y/o la posición descrito está dentro de un intervalo esperado razonable de valores y/o posiciones. Por ejemplo, un valor numérico puede tener un valor que es +/- 0,1 % del valor establecido (o intervalo de valores), +/- 1 % del valor establecido (o intervalo de valores), +/- 2 % del valor establecido (o intervalo de valores), +/- 5 % del valor establecido (o intervalo de valores), +/- 10 % del valor establecido (o intervalo de valores), etc. Cualquier valor numérico dado en el presente documento también se debe entender que incluye aproximadamente ese valor, a menos que el contexto lo indique de otro modo. Por ejemplo, si se divulga el valor "10", entonces también se divulga "aproximadamente 10". Cualquier intervalo numérico enumerado en el presente documento pretende incluir todos los subintervalos incluidos en el mismo. También se entiende que cuando se divulga un valor, también se divulga "menor que o igual a" el valor, "mayor que o igual al valor" y posibles intervalos entre valores, como se entiende apropiadamente por el experto en la técnica. Por ejemplo, si se divulga el valor "X", también se divulga "menor que o igual a X" así como "mayor que o igual a X" (por ejemplo, donde X es un valor numérico). También se entiende que en toda la solicitud, los datos se proporcionan en una serie de diferentes formatos y que estos datos representan puntos finales y puntos de inicio, e intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si se divulgan un punto de datos particular "10" y un punto de datos particular "15", se entiende que se consideran divulgados mayor que, mayor que o igual a, menor que, menor que o igual a, e igual a 10 y 15, así como entre 10 y 15. También se entiende que también se divulga cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se divulgan 10 y 15, entonces también se divulgan 11, 12, 13 y 14.

Aunque anteriormente se describen diversos modos de realización ilustrativos, se pueden realizar diversos cambios en diversos modos de realización sin alejarse del alcance de la invención como se describe por las reivindicaciones. Por ejemplo, el orden en el que se realizan las diversas etapas de procedimiento descritas a menudo se puede cambiar en modos de realización alternativos, y en otros modos de realización alternativos se pueden omitir por completo una o más etapas de procedimiento. Los rasgos característicos opcionales de diversos modos de realización de dispositivo y sistema se pueden incluir en algunos modos de realización y no en otros. Por lo tanto, la descripción anterior se proporciona principalmente con propósitos ejemplares y no se debe interpretar como que limita el alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones.

Los ejemplos e ilustraciones incluidos en el presente documento muestran, a modo de ilustración y no de limitación, modos de realización específicos en los que se puede practicar la materia objeto. Como se menciona, se pueden utilizar otros modos de realización y derivarlos de los mismos, de modo que se pueden realizar sustituciones y cambios estructurales y lógicos sin apartarse del alcance de esta divulgación. Dichos modos de realización de la materia objeto según la invención se pueden denominar en el presente documento individual o conjuntamente por el término "invención" simplemente por conveniencia y sin intención de limitar voluntariamente el alcance de esta solicitud a ninguna invención o concepto según la invención individual, si de hecho se divulga más de uno. Por tanto, aunque en el presente documento se han ilustrado y descrito modos de realización específicos, cualquier disposición calculada para lograr el mismo propósito puede sustituir los modos de realización específicos mostrados. Esta divulgación pretende cubrir todas y cada una de las adaptaciones o variaciones de diversos modos de realización. Las combinaciones de los modos de realización anteriores y otros modos de realización no descritos específicamente en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica después de revisar la descripción anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para formar una matriz de celdas de sensor de nanoporos, comprendiendo el procedimiento: introducir un nanoporo próximo a una celda, teniendo la celda un electrodo de trabajo y una membrana sellando la celda, en el que el electrodo de trabajo se alimenta por una fuente de energía acoplada eléctricamente;

aplicar una forma de onda de voltaje a través de la membrana de la celda, en el que la forma de onda de voltaje comienza con un primer voltaje y se incrementa en magnitud durante un período de tiempo hasta un segundo voltaje; e

insertar el nanoporo en la membrana durante la etapa de aplicación de la forma de onda de voltaje, en el que la forma de onda de voltaje comprende una pluralidad de etapas incrementales entre el primer voltaje y el segundo voltaje.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer voltaje está entre aproximadamente 0 y 100 mV y el segundo voltaje está entre aproximadamente 100 a 2000 mV.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el electrodo de trabajo es un electrodo capacitivo.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de etapas incrementales se incrementan en aproximadamente 1 a 100 mV.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de etapas incrementales se incrementan en aproximadamente 1 a 25 mV.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 5, en el que cada etapa incremental tiene una duración de entre aproximadamente 0,1 a 60 segundos.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la duración de las etapas incrementales es variable.

8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la duración de las etapas incrementales a voltajes menores es mayor que la duración de las etapas incrementales a voltajes mayores.

9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la duración de las etapas incrementales es constante.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la forma de onda de voltaje comprende una rampa entre el primer voltaje y el segundo voltaje.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la rampa está entre aproximadamente 0,1 a 2,0 V por minuto.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la rampa tiene una pendiente constante.

13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la rampa tiene una pendiente variable.

14. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la rampa tiene una pendiente a voltajes menores que es menor que la pendiente a voltajes mayores.

15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la etapa de aplicar la forma de onda de voltaje se aplica a una membrana no adelgazada.

16. El procedimiento de la reivindicación 15, que comprende además adelgazar la membrana no adelgazada con la forma de onda de voltaje aplicada.

17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fuente de energía se acopla a CA al electrodo de trabajo.

18. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la forma de onda de voltaje comprende una componente de modulación de CA, estando configurada la componente de modulación de CA para permitir que se tomen mediciones eléctricas a través del electrodo de trabajo mientras la forma de onda de voltaje se aplica a través de la membrana de la celda.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la componente de modulación de CA tiene una amplitud de menos de 100 mV.

20. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la componente de modulación de CA tiene una frecuencia

de entre 10 Hz y 1000 Hz.

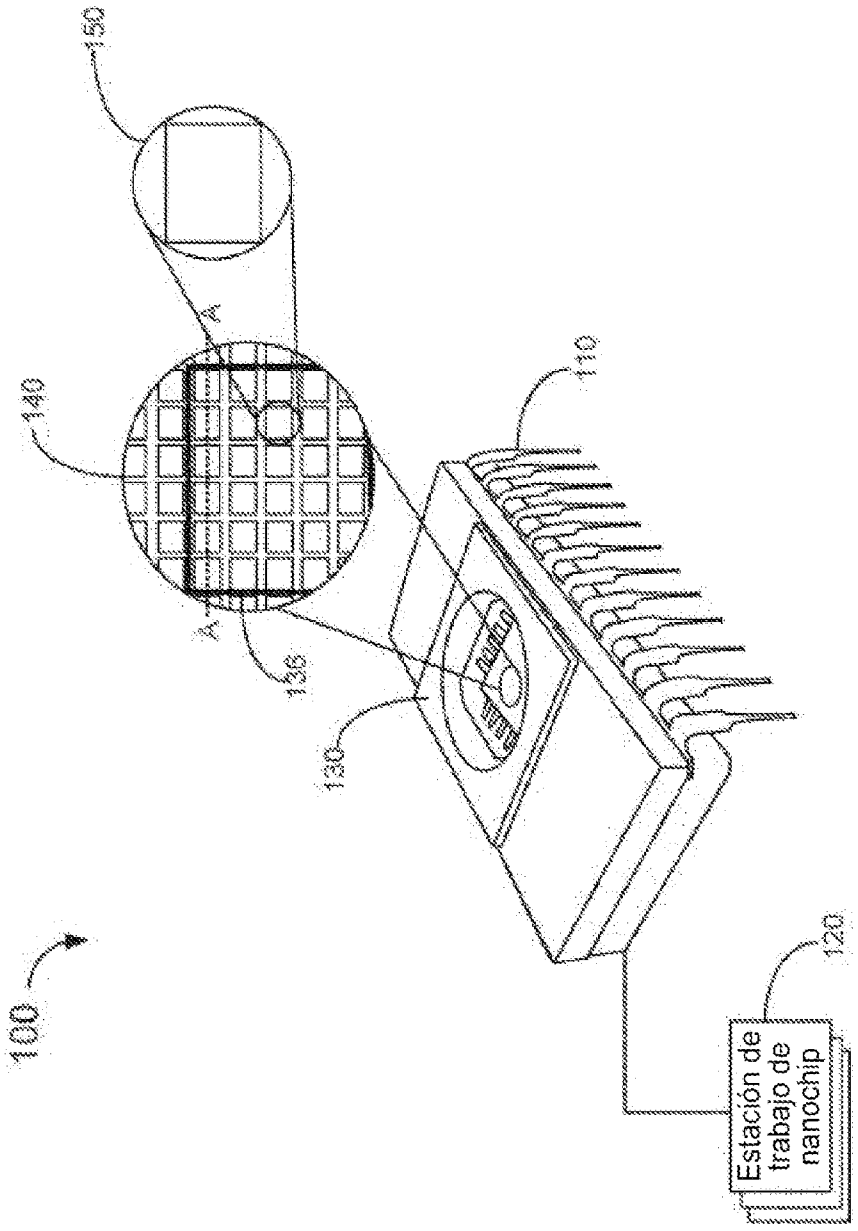

150
A
A
140
110
136
130
100
120
Estación de trabajo de nanochip

FIG. 1

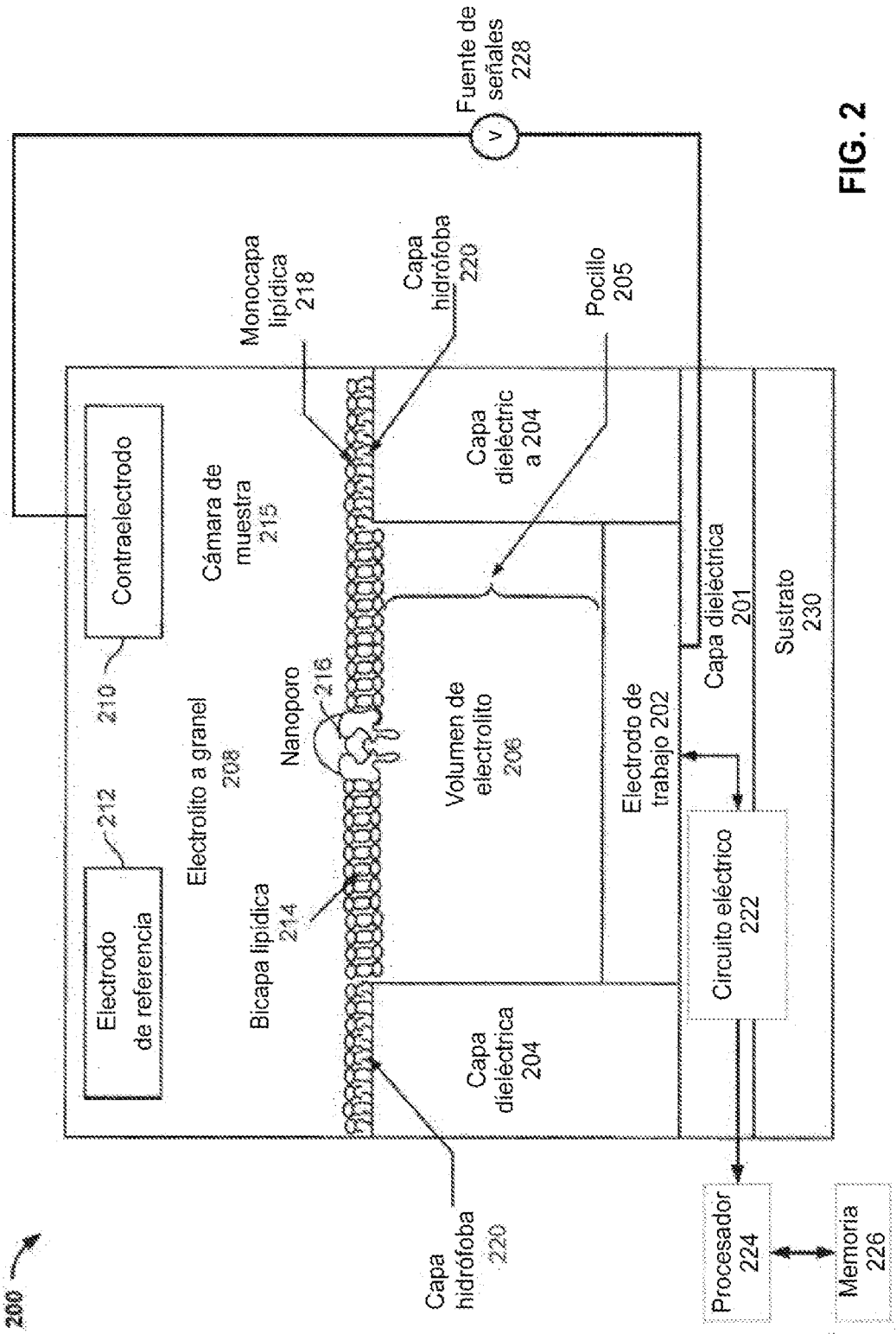

200
Fuente de señales 228
V
Monocapa lipídica 218
Capa hidrófoba 220
Pocillo 205
Contraelectrodo
210
Cámara de muestra 215
Capa dieléctrica 204
Capa dieléctrica 201
Sustrato 230
Electrodo de referencia
212
Electrolito a granel 208
Nanoporo 216
Volumen de electrolito 206
Electrodo de trabajo 202
Bicapa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

FIG. 2

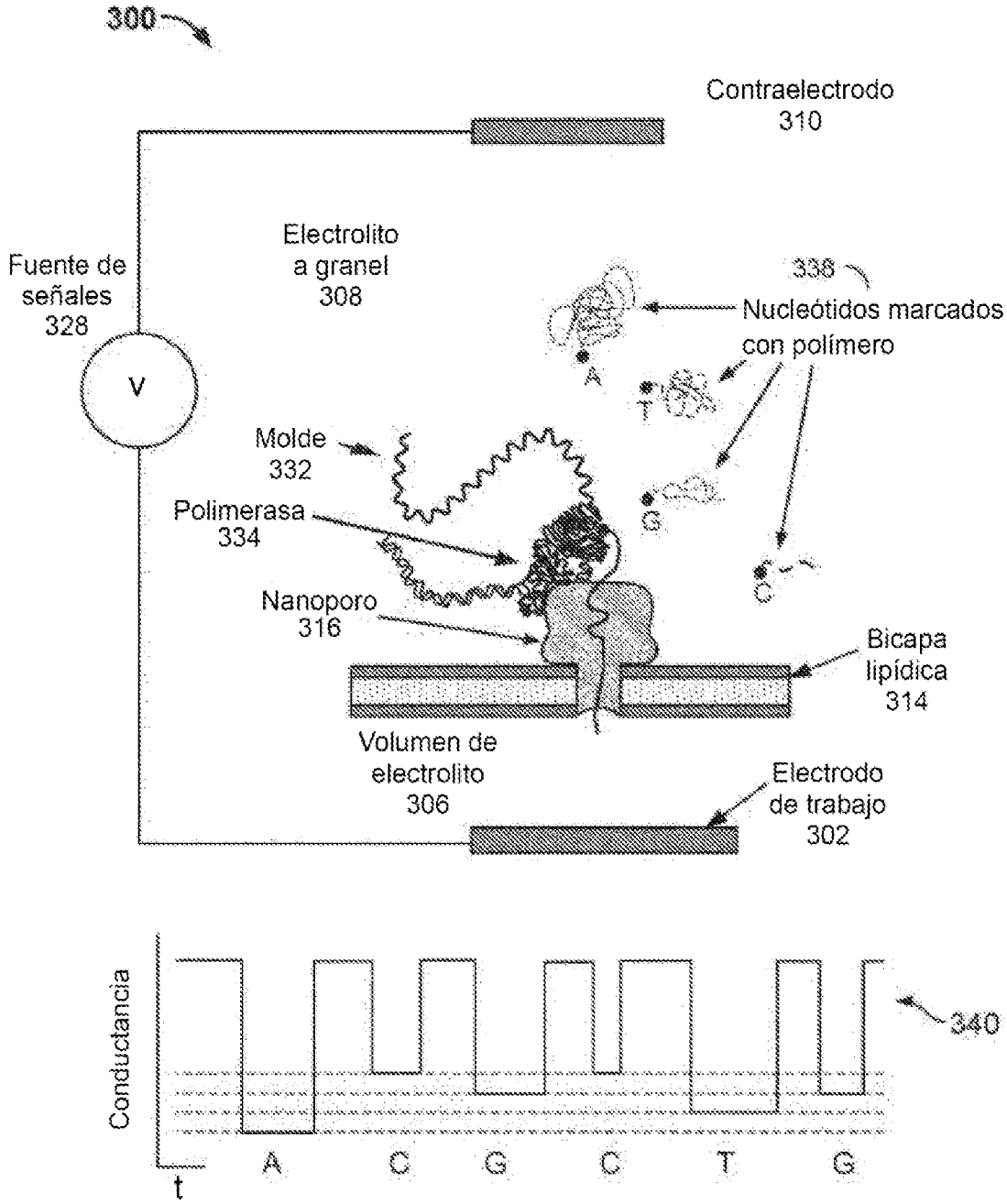

300
Contraelectrodo
310
Electrolito
a granel
308
Fuente de
señales
328
V
338
Nucleótidos marcados
con polímero
A
T
G
C
Molde
332
Polimerasa
334
Nanoporo
316
Bicapa
lipídica
314
Volumen de
electrolito
306
Electrodo
de trabajo
302
Conductancia
340
A
C
G
C
T
G
t

FIG. 3

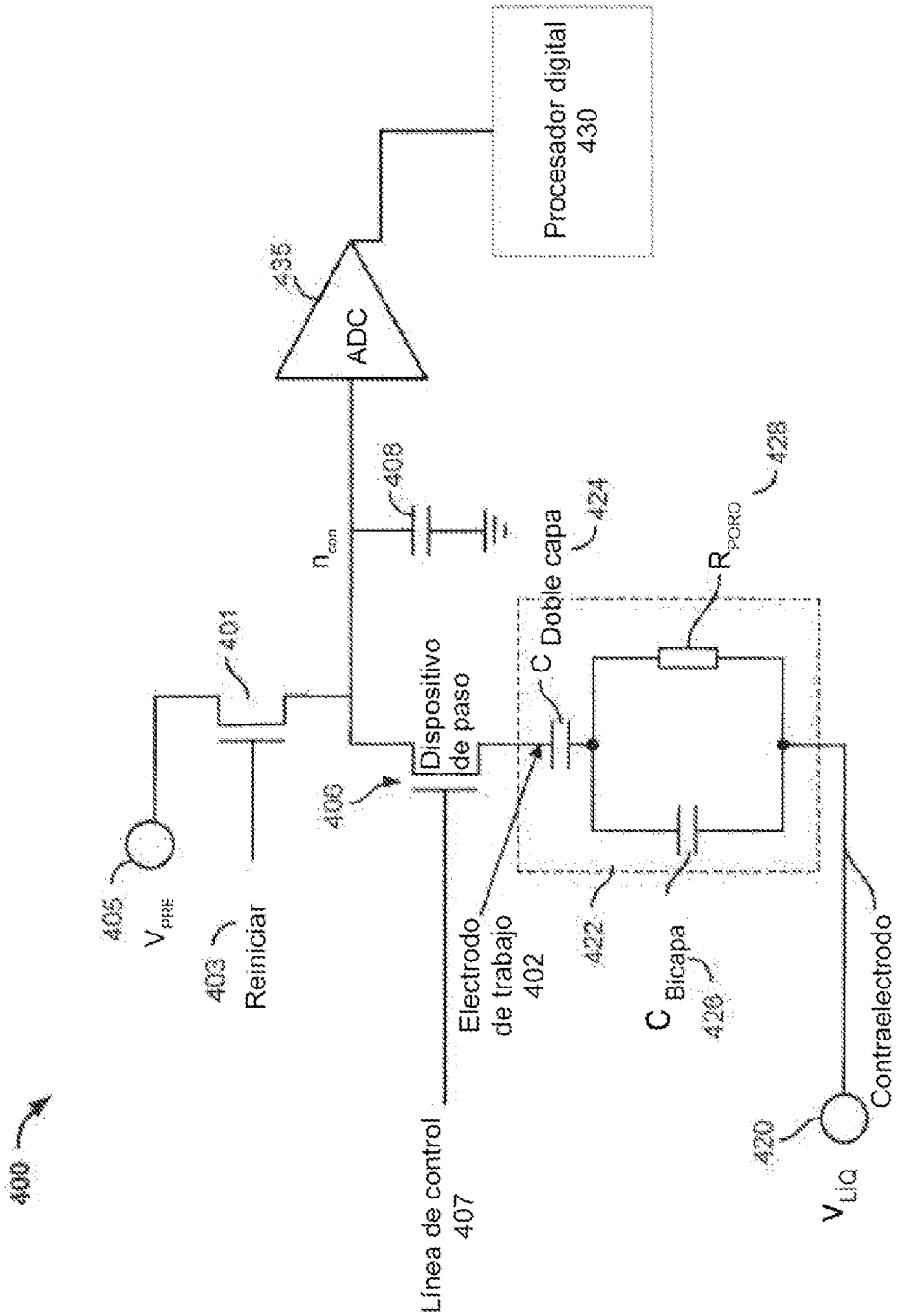

400
Procesador digital
430
436
ADC
n_{con}
408
424
C Doble capa
428
R_{PORO}
401
Dispositivo de paso
406
405
V_{PPE}
403
Reiniciar
Electrodo de trabajo
402
422
C Bicapa
426
Línea de control
407
420
V_{Liq}
Contraelectrodo
410

FIG. 4

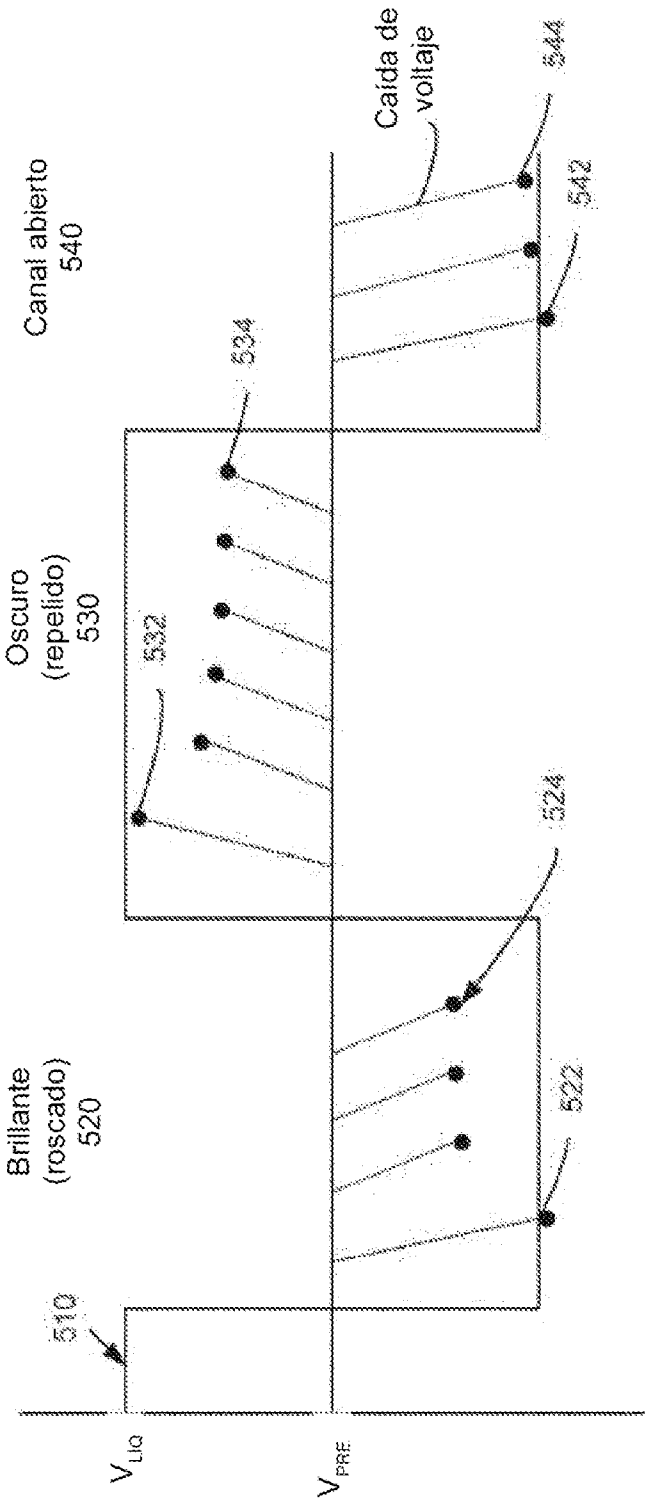

Canal abierto
540
Oscuro
(repelido)
530
Brillante
(roscado)
520
Caída de
voltaje
544
542
534
532
524
522
510
V_{LIQ}
V_{PRE}

FIG. 5

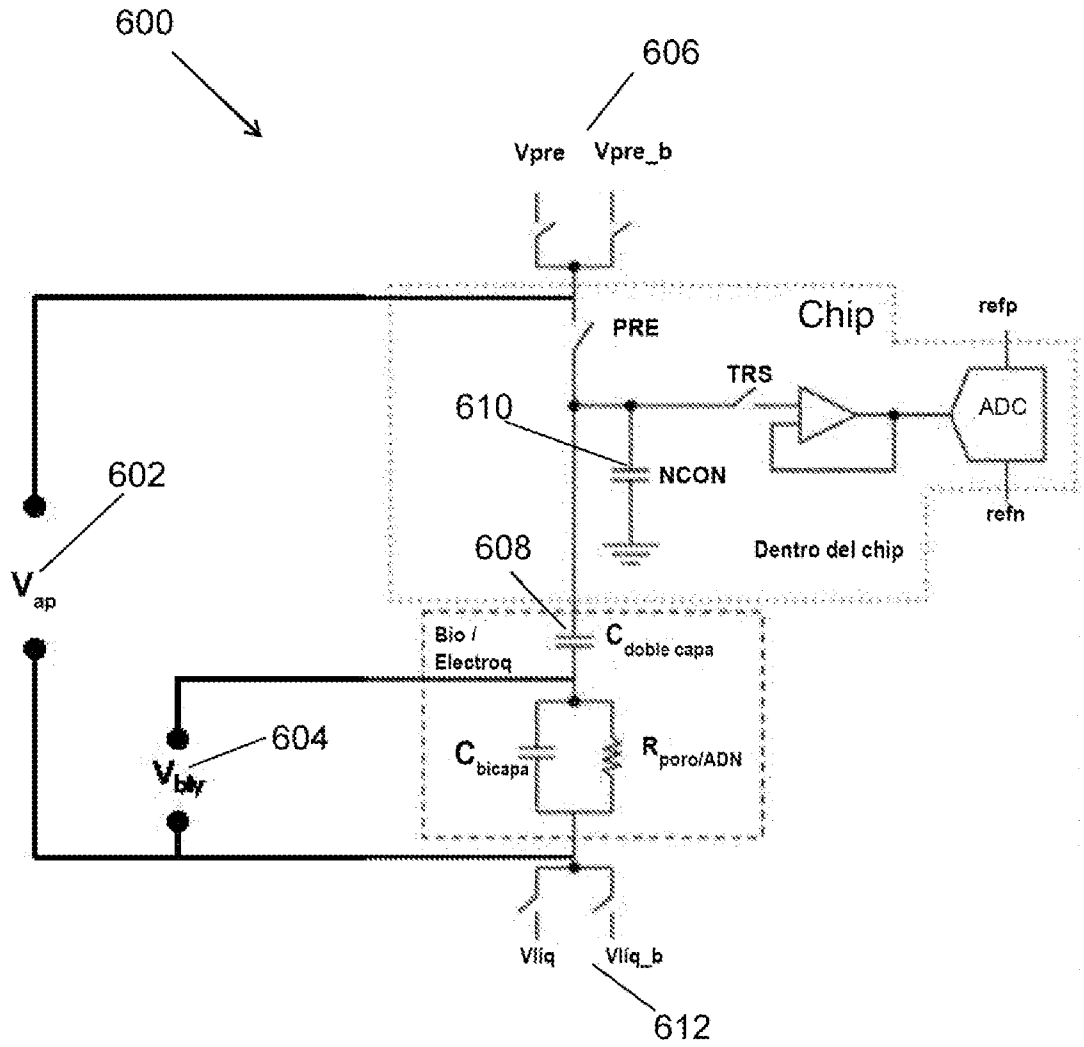

600
606
Vpre
Vpre_b
Chip
refp
PRE
TRS
610
ADC
NCON
602
refn
608
Dentro del chip
Bio /
Electroq
C doble capa
604
C bicapa
R poro/ADN
Vliq
Vliq_b
612

FIG. 6

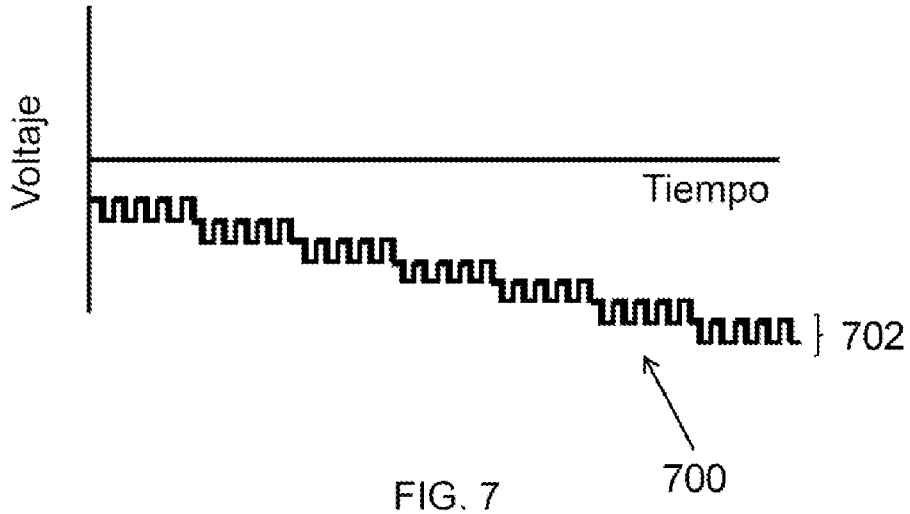


FIG. 7

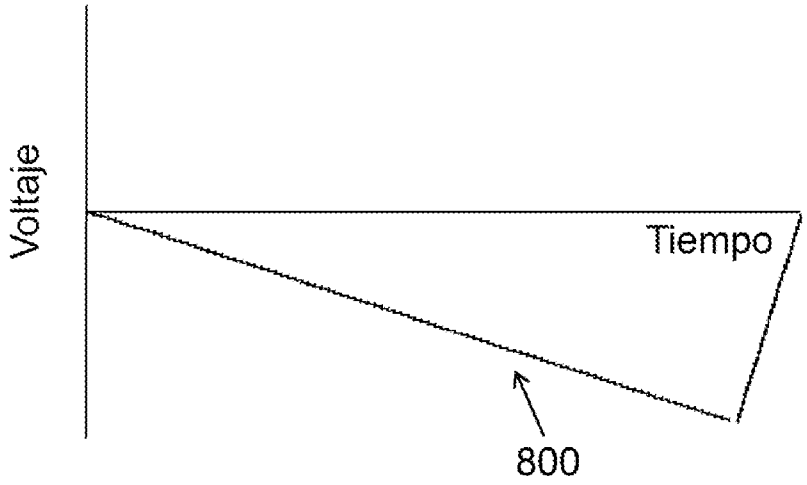


FIG. 8A

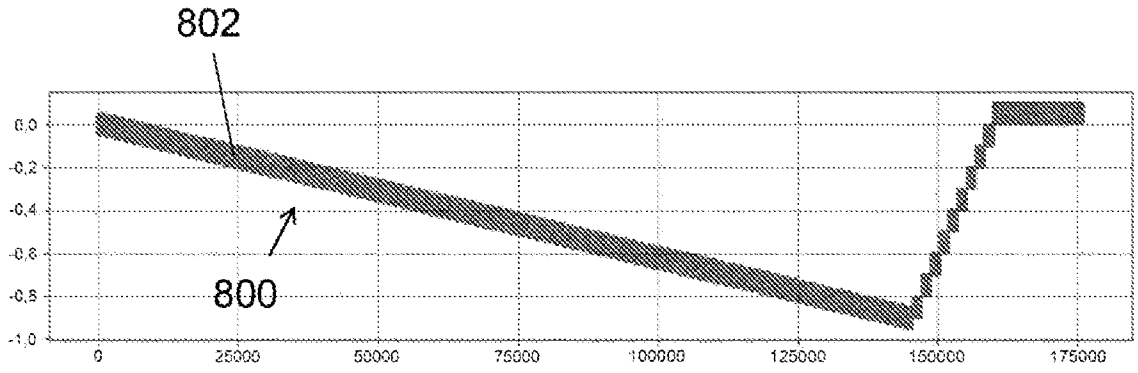


FIG. 8B

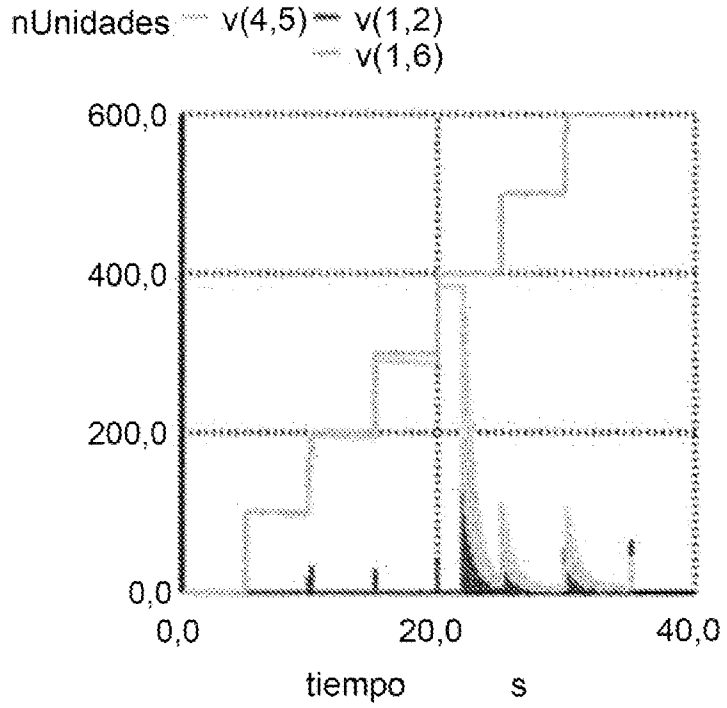

nUnidades
v(4,5)
v(1,2)
v(1,6)
600,0
400,0
200,0
0,0
0,0
20,0
40,0
tiempo
s

FIG. 9A

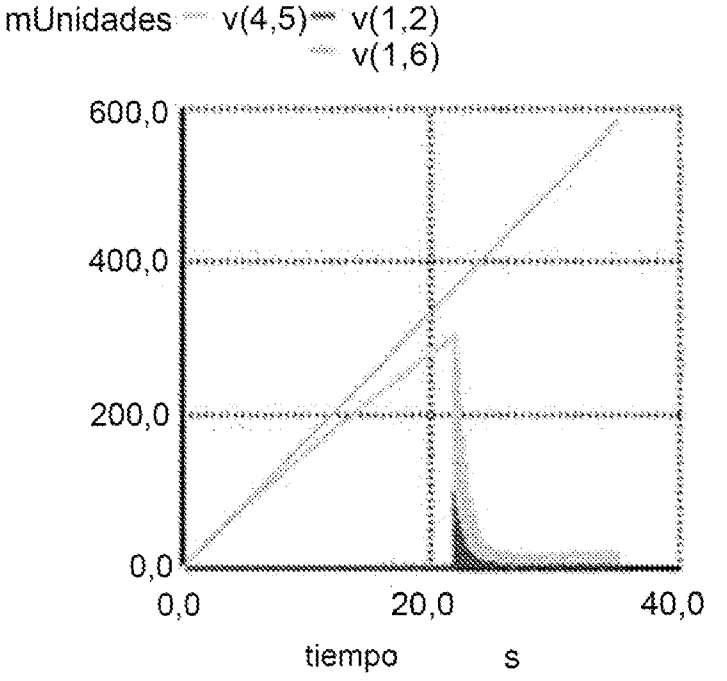

mUnidades
v(4,5)
v(1,2)
v(1,6)
600,0
400,0
200,0
0,0
0,0
20,0
40,0
tiempo
s

FIG. 9B

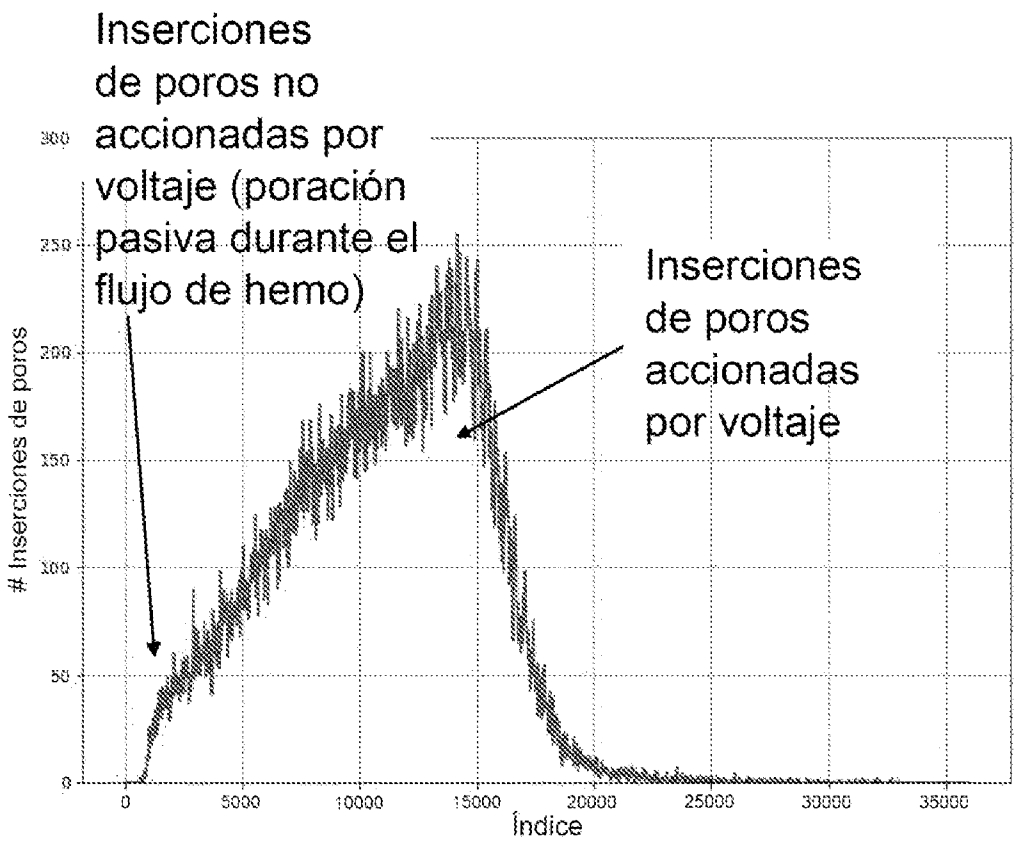


FIG. 10A

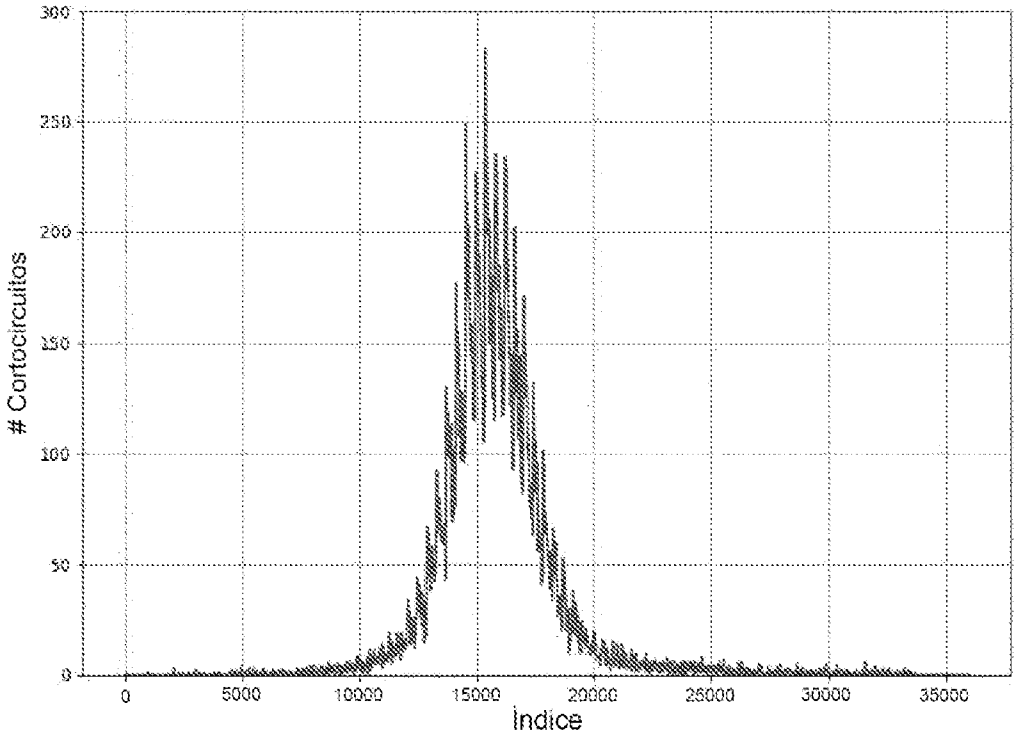


FIG. 10B

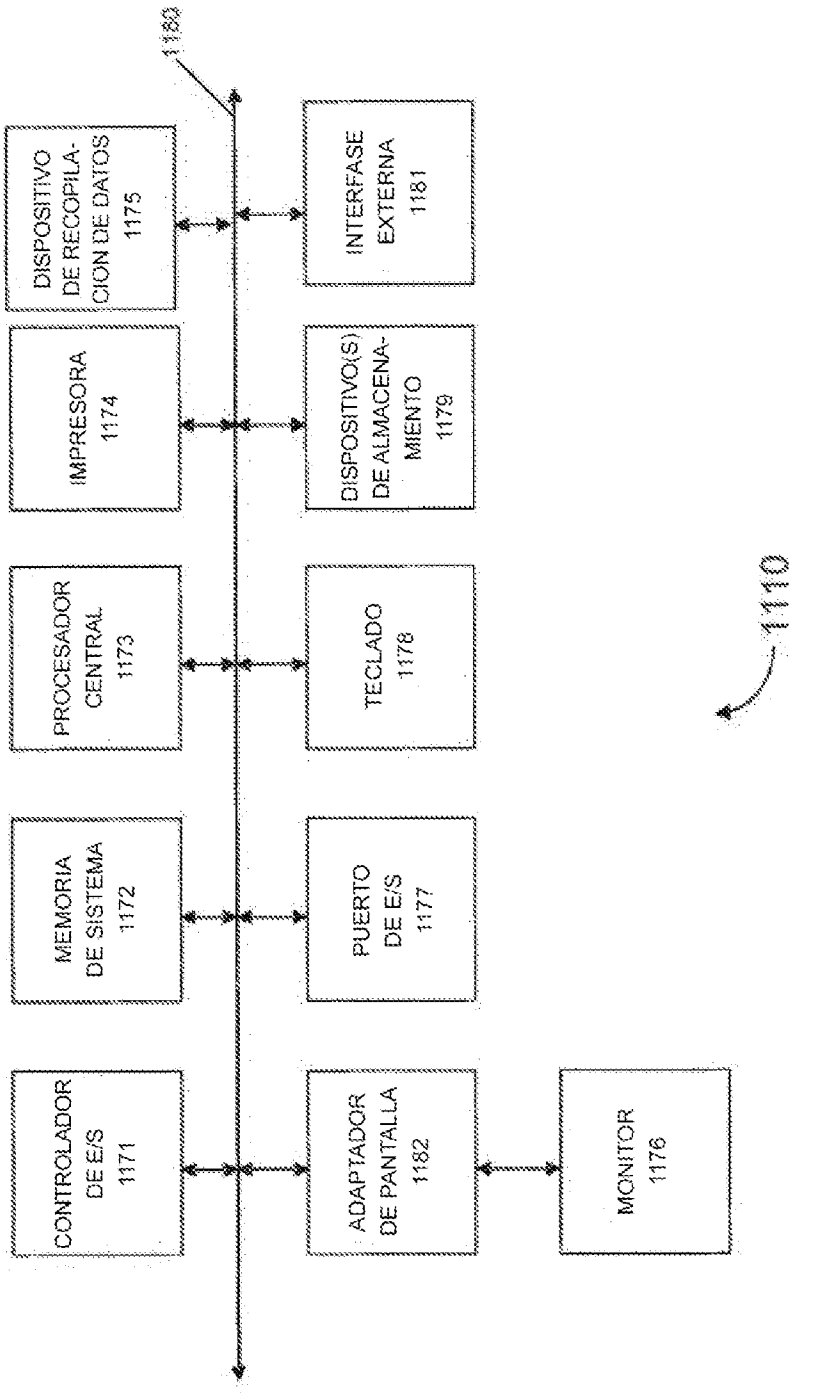

1180
DISPOSITIVO DE RECOPILACION DE DATOS 1175
INTERFASE EXTERNA 1181
IMPRESORA 1174
DISPOSITIVO(S) DE ALMACENAMIENTO 1179
PROCESADOR CENTRAL 1173
TECLADO 1178
MEMORIA DE SISTEMA 1172
PUERTO DE E/S 1177
CONTROLADOR DE E/S 1171
ADAPTADOR DE PANTALLA 1182
MONITOR 1176
1110

FIG. 11