

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 634**

51 Int. Cl.:

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA LIMITADA

T7

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2012 PCT/US2012/047107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13012881**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2012 E 12815570 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras limitación: **07.06.2017 EP 2734840**

54 Título: **Dispositivo de poro dual**

30 Prioridad:

20.07.2011 US 201161572843 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente limitada:
02.08.2017

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**DUNBAR, WILLIAM y
KIM, JUNGSUK**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 565 634 T7

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de poro dual

Esta solicitud reivindica el beneficio, bajo 35 U.S.C. § 119(e), de la solicitud provisional de EEUU n.º 61/572.843, presentada el 20 de julio, 2011.

5 **Antecedentes**

10 Un nanoporo es una abertura de escala nanométrica que se forma de modo natural como canal de proteínas en una membrana lipídica (un poro biológico), o se fabrica taladrando o grabando la abertura en un sustrato en estado sólido (un poro en estado sólido). Cuando dicho nanoporo se incorpora en un nanodispositivo que comprende dos cámaras que están separadas por el nanoporo puede emplearse un amplificador de pinzamiento zonal de membrana sensible para aplicar un voltaje transmembrana y medir la corriente iónica a través del poro.

15 Los nanoporos son muy prometedores para la secuenciación barata del ADN genómico completo. A este respecto, las moléculas de ADN individuales pueden capturarse y hacerse pasar a través del poro mediante electroforesis, y cada acontecimiento de captura puede detectarse como un desplazamiento temporal en la corriente iónica. Después puede inferirse la secuencia de una molécula de ADN a partir de los patrones dentro del registro de la corriente iónica desplazada, o partir de otro detector auxiliar en el nanoporo o cerca de este, a medida que el ADN pasa a través del canal del poro.

20 En principio, un secuenciador de nanoporos puede eliminar la necesidad de amplificar la muestra, del uso de enzimas y reactivos empleados para la función catalítica durante la operación de secuenciación, y de instrumentos ópticos para la detección del avance de la secuenciación, algunos de los cuales o todos son necesarios en los métodos de secuenciación por síntesis convencionales.

Los detectores de nanoporos son puramente eléctricos y pueden detectar ADN en concentraciones/volúmenes que no son mayores que los disponibles en una muestra de sangre o saliva. Además, los nanoporos prometen aumentar drásticamente la longitud de lectura del ADN secuenciado, de 450 bases a más de 10.000 bases.

25 Existen dos principales obstáculos a la secuenciación con nanoporos: (1) la falta de sensibilidad suficiente para determinar con precisión la identidad de cada nucleótido en el ácido nucleico para la secuenciación *de novo* (la falta de sensibilidad de nucleótidos individuales), y (2) la capacidad para regular la velocidad de transporte de cada unidad de nucleótido a través del nanoporo durante la detección. Aunque muchos grupos de investigación están desarrollando y mejorando los nanoporos para intentar solucionar el obstáculo 1, no existe ningún método para solucionar el obstáculo 2 que no implique el uso de enzimas o instrumentos ópticos, que solo sirven para técnicas de nanoporos especializadas y provocan un aumento en los costes y la complejidad, comparado con los métodos puramente eléctricos. El documento EP 1645628 describe un aparato y un método para la separación, la retirada, la concentración o el aislamiento de un biopolímero (ADN, ARN) a partir de una muestra mixta translocando un biopolímero de un tamaño seleccionado desde un depósito a otro a través de un nanoporo. El documento US 2005/227239 describe un método y un aparato para separar e identificar un resto químico en el que una molécula diana se une a una sonda, se libera de la sonda y se identifica o secuencia mediante un sistema de nanoporos en estado sólido. El sistema de nanoporos se diseña para recibir la molécula diana y para registrar y cuantificar su naturaleza, número, perfil de elusión y orden de elución de la matriz de unión. Pedone *et al.* (29 de octubre, 2010), J. Physics: Condensed Matter, 22(45), p. 454115) describen la fabricación y la caracterización de un dispositivo de poro-cavidad-poro que consiste en una cavidad de dimensiones micrométricas con dos nanoporos que actúan como entrada y salida. El dispositivo puede utilizarse para investigar objetos no cargados en geometrías confinadas.

Resumen

45 En una realización, se proporciona un dispositivo que comprende una cámara superior, una cámara intermedia y una cámara inferior, en el que la cámara superior está en comunicación con la cámara intermedia a través de un primer poro, y la cámara intermedia está en comunicación con la cámara inferior a través de un segundo poro, en el que el primer poro y el segundo poro tienen un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, y están separados entre sí por una distancia de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1000 nm, y en el que cada una de las cámaras comprende un electrodo para conectarse a una fuente de energía.

En un aspecto, el primer y el segundo poro son sustancialmente coaxiales.

50 En un aspecto, el dispositivo comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, grafeno, nanotubos de carbono, TiO₂, HfO₂, Al₂O₃, capas metálicas, vidrio, nanoporos biológicos, membranas con poros biológicos insertados y sus combinaciones.

En un aspecto, el primer poro y el segundo poro tienen una profundidad de aproximadamente 0,3 nm a aproximadamente 100 nm.

En un aspecto, el suministro de energía se configura para proporcionar un primer voltaje entre la cámara superior y

la cámara intermedia, y un segundo voltaje entre la cámara intermedia y la cámara inferior, y en el que el primer voltaje y el segundo voltaje son ajustables independientemente.

5 En un aspecto, el suministro de energía comprende un sistema pinzamiento de voltaje o de pinzamiento zonal de membrana para generar cada uno del primer y segundo voltaje. En un aspecto, la cámara intermedia se ajusta para que esté conectada a tierra con relación a los dos voltajes. En un aspecto, la cámara intermedia comprende un medio para proporcionar conductancia entre cada uno de los poros y el electrodo en la cámara intermedia.

En algunos aspectos, el suministro de energía, tal como el sistema de pinzamiento de voltaje o el sistema de pinzamiento zonal de membrana, también se configura para medir la corriente iónica entre cada uno de los poros.

10 Otra realización proporciona un dispositivo que comprende una cámara superior, una cámara intermedia y una cámara inferior, en el que la cámara superior está en comunicación con la cámara intermedia a través de un primer poro, y la cámara intermedia está en comunicación con la cámara inferior a través de un segundo poro, y en el que el primer poro y el segundo poro tienen un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, y están separados entre sí por una distancia de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1000 nm; y un electrodo en cada una de las cámaras para conectarse a un sistema de pinzamiento de voltaje o de pinzamiento zonal de membrana para aplicar un voltaje y medir la corriente iónica a través de cada uno de los poros, en el que el electrodo en la cámara intermedia está conectado a una tierra común de los dos sistemas de pinzamiento de voltaje o de pinzamiento zonal de membrana.

20 También se proporciona, en una realización, un método para controlar el movimiento de un polímero cargado a través de un poro, que comprende: (a) cargar una muestra que comprende un polímero cargado en una de la cámara superior, la cámara intermedia o la cámara inferior del dispositivo de cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el dispositivo está conectado a un sistema de pinzamiento de voltaje o un sistema de pinzamiento zonal de membrana para proporcionar un primer voltaje entre la cámara superior y la cámara intermedia, y un segundo voltaje entre la cámara intermedia y la cámara inferior; (b) ajustar un primer voltaje inicial y un segundo voltaje inicial, de modo que el polímero se mueva entre las cámaras, situando con ello al polímero a través del primer y del segundo poro; y (c) ajustar el primer voltaje y el segundo voltaje de modo que ambos voltajes generen una fuerza para arrastrar al polímero cargado de la cámara intermedia, en el que los dos voltajes son diferentes en magnitud, bajo condiciones controladas, de modo que el polímero cargado se mueva a través de ambos poros en una dirección y de una manera controlada.

30 En un aspecto, la manera controlada de transporte se establece mediante el control activo o el control retroalimentado del primero o el segundo voltaje o ambos, teniendo cualquiera o ambos una función de retroalimentación de la primera o la segunda o ambas mediciones de la corriente iónica. Un ejemplo no limitante incluye mantener el segundo voltaje constante y emplear la segunda corriente iónica como retroalimentación para el control retroalimentado o activo del primer voltaje, para establecer un transporte controlado de un polímero cargado en cualquier dirección. Por consiguiente, en un aspecto, el primer voltaje se ajusta basándose en una corriente iónica medida a través del segundo poro.

35 En un aspecto, la muestra se carga en la cámara superior y el primer voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero cargado de la cámara superior hacia la cámara intermedia, y el segundo voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero de la cámara intermedia hacia la cámara inferior.

40 En otro aspecto, la muestra se carga en la cámara intermedia y el primer voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero cargado de la cámara intermedia hacia la cámara superior, y el segundo voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero cargado de la cámara intermedia hacia la cámara inferior.

En un aspecto, el polímero cargado es un polinucleótido o un polipéptido. En un aspecto, el polímero cargado es un polinucleótido tal como, pero sin limitarse a un ADN bicatenario, un ADN monocatenario, un ARN bicatenario, un ARN monocatenario o un híbrido de ADN-ARN.

45 En un aspecto, el primer voltaje y el segundo voltaje ajustados en la etapa (c) son de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 10.000 veces tan altos, en magnitud, como la diferencia entre los dos voltajes.

50 En un aspecto, el método comprende además identificar una unidad monomérica del polímero midiendo una corriente iónica a través de uno de los poros cuando la unidad monomérica pasa a través de ese poro. En un aspecto, la unidad monomérica es un nucleótido. En otro aspecto, la unidad monomérica es una pareja de nucleótidos. Los nucleótidos individuales y las parejas de nucleótidos, en algunos aspectos, pueden detectarse en una molécula. Por ejemplo, esta molécula puede tener un segmento de dúplex en un polinucleótido más largo que, por lo demás, es monocatenario, habiéndose formado el dúplex parcial o totalmente mediante apareamiento de bases complementarias de Watson-Crick.

55 En un aspecto, el monómero se une a una molécula, tal como una proteína de unión al ADN, o una nanopartícula. Los ejemplos no limitantes de proteínas de unión al ADN incluyen la proteína RecA y proteínas de unión al ADN específicas de secuencia, tales como el represor del fago lambda, NF- κ B y p53. Los ejemplos no limitantes de nanopartículas incluyen los puntos cuánticos y los marcadores fluorescentes.

En un aspecto, el polímero está unido a un soporte sólido, tal como una esfera, en un extremo del polímero.

Otra realización proporciona un método para determinar la secuencia de un polinucleótido, que comprende: (a) cargar una muestra que comprende un polinucleótido en la cámara superior del dispositivo de cualquiera de las anteriores realizaciones, en el que el dispositivo está conectado a un sistema de pinzamiento de voltaje o un sistema de pinzamiento zonal de membrana para proporcionar un primer voltaje entre la cámara superior y la cámara intermedia, y un segundo voltaje entre la cámara intermedia y la cámara inferior, en el que el polinucleótido está unido opcionalmente a un soporte sólido en un extremo del polinucleótido; (b) ajustar un primer voltaje inicial y un segundo voltaje inicial de modo que el polinucleótido se mueve desde la cámara superior hacia la cámara intermedia y desde la cámara intermedia hacia la cámara inferior, situando con ello al polímero a través de ambos primer y segundo poro; (c) ajustar el primer voltaje y el segundo voltaje de modo que ambos voltajes generen una fuerza para arrastrar al polinucleótido de la cámara intermedia, en el que los dos voltajes son diferentes en magnitud, bajo condiciones controladas, de modo que el polinucleótido se mueve a través de ambos poros en una dirección y de una manera controlada. y (d) identificar cada nucleótido del polinucleótido que pasa a través de uno de los poros, mediante la medición de una corriente iónica a través del poro cuando el nucleótido pasa a través de ese poro.

15 Breve descripción de los dibujos

Las figuras de los dibujos adjuntos describen las realizaciones proporcionadas solo como ilustración, en las que:

FIG. 1(I)-(III) ilustra un dispositivo de dos poros (de poro dual). **(I)** Esquema de la configuración del chip de poro dual y de los componentes electrónicos del amplificador dual para el control del voltaje (V_1 , V_2) y las mediciones de corriente (I_1 , I_2) independientes de cada poro. Las cámaras (A-C) están volumétricamente separadas excepto por los poros comunes. Los parámetros posibles del chip son una distancia entre poros de 10-500 nm, un espesor de membrana de 0,3-50 nm, y un diámetro de los poros de 1-100 nm. **(II)** Eléctricamente, V_1 y V_2 son principalmente a través de cada resistencia del nanoporo, construyendo un dispositivo que minimiza todas las resistencias de acceso para desacoplar I_1 e I_2 de forma eficaz. **(III)** Se emplearán voltajes competidores para el control, y las flechas azules muestra la dirección de cada fuerza de voltaje. Suponiendo la existencia de los poros con idéntica influencia de voltaje-fuerza y empleado $|V_1| = |V_2| + \delta V$, el valor $\delta V > 0$ (< 0) se ajusta para un movimiento sintonizable en la dirección V_1 (V_2). En la práctica, aunque la fuerza inducida por el voltaje en cada poro no será idéntica a $V_1 = V_2$, unos experimentos de calibración pueden identificar el sesgo de voltaje requerido que produzca fuerzas de igual capacidad de arrastre, para un chip de dos poros concreto, y después pueden utilizarse las variaciones alrededor de ese sesgo para el control direccional; y

FIG. 2 muestra una vista externa de un dispositivo de alojamiento de dos poros que presenta una cámara A, una cámara B y una cámara C, en las que cada una presenta una abertura para el acceso de fluidos y la carga de muestras. Un chip de poro dual se coloca entre dos juntas, siendo cada junta parte de cada porción del dispositivo de alojamiento, y las dos porciones rotan alrededor de una bisagra (arriba en el centro) para abrir y cerrar el alojamiento alrededor del chip.

Algunas de las figuras son representaciones esquemáticas que se ofrecen como ejemplo; por tanto, no muestran necesariamente los tamaños relativos o las localizaciones reales de los elementos mostrados. Las figuras se presentan con el fin de ilustrar una o más realizaciones con la comprensión explícita de que no se utilizarán para limitar el alcance o el significado de las reivindicaciones que aparecen a continuación.

Descripción detallada

A lo largo de esta solicitud, el texto se refiere a diversas realizaciones de los presentes nutrientes, composiciones y métodos. Las diversas realizaciones descritas pretenden proporcionar una diversidad de ejemplos ilustrativos y no deben considerarse como descripciones de especies alternativas. En su lugar, debe advertirse que las descripciones de las diversas realizaciones proporcionadas en la presente pueden tener un alcance solapante. Las realizaciones analizadas en la presente son simplemente ilustrativas y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

También a lo largo de esta descripción se mencionan diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas mediante una cita identificativa. Las descripciones de estas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas se incorporan en la presente descripción como referencia para describir más a fondo la técnica actual a la cual pertenece esta invención.

Tal como se emplea en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un/una" y "el/la" incluye la referencia en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un electrodo" incluye una pluralidad de electrodos e incluye sus mezclas.

Tal como se emplea en la presente, el término "comprende" significa que los dispositivos y los métodos incluyen los componentes o etapas indicados, pero no se excluyen otros. "Que consiste fundamentalmente en", cuando se emplea para definir dispositivos y métodos, significa que se excluyen otros componentes o etapas de cualquier significado fundamental para la combinación. "Que consiste en" significa que se excluyen otros componentes o etapas. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos y expresiones de transición están dentro del alcance de esta invención.

5 Todas las denominaciones numéricas, por ejemplo, distancia, tamaño, temperatura, tiempo, voltaje y concentración, incluyendo los intervalos, son aproximaciones que pueden variar (+) o (-) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se menciona explícitamente, que todas las denominaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se menciona explícitamente, que los componentes descritos en la presente son simplemente ejemplos y que en la técnica se conocen equivalentes de estos.

Dispositivo de dos poros

10 Una realización de la presente descripción proporciona un dispositivo de dos poros. El dispositivo incluye tres cámaras y dos poros que permiten la comunicación fluida entre las cámaras. Además, cada una de las cámaras contiene un electrodo para conectarse a un suministro de energía, de modo que puede establecerse un voltaje separado a través de cada uno de los poros entre las cámaras.

15 Según una realización de la presente descripción, se proporciona un dispositivo que comprende una cámara superior, una cámara intermedia y una cámara inferior, en el que la cámara superior está en comunicación con la cámara intermedia a través de un primer poro, y la cámara intermedia está en comunicación con la cámara inferior a través de un segundo poro, en el que el primer poro y el segundo poro tienen un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, y están separados entre sí por una distancia de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1000 nm, y en el que cada una de las cámaras comprende un electrodo para conectarse a una fuente de energía.

20 Haciendo referencia a la **FIG. 1(I)**, el dispositivo incluye una cámara superior (cámara A), una cámara intermedia (cámara B), y una cámara inferior (cámara C). Las cámaras están separadas por dos capas de separación o membranas (101 y 102) que poseen cada una un poro distinto (111 y 112). Además, cada cámara contiene un electrodo (121, 122 y 123) para la conexión a un suministro de energía. Es evidente que la anotación de la cámara superior, intermedia e inferior es relativa y no indica, por ejemplo, que la cámara superior esté colocada por encima de la cámara intermedia o inferior con relación al suelo, o viceversa.

25 Cada uno de los poros (111 y 112) independientemente tiene un tamaño que permite que una molécula pequeña o grande o un microorganismo pase. En un aspecto, cada poro tiene un diámetro de al menos aproximadamente 1 nm. Como alternativa, cada poro tiene un diámetro de al menos aproximadamente 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 11 nm, 12 nm, 13 nm, 14 nm, 15 nm, 16 nm, 17 nm, 18 nm, 19 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm o 100 nm.

30 En un aspecto, el poro tiene un diámetro no mayor que aproximadamente 100 nm. Como alternativa, el poro tiene un diámetro no mayor que aproximadamente 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 o 10 nm.

35 En un aspecto, el poro tiene un diámetro que está entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm, o como alternativa entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 80 nm, o entre aproximadamente 3 nm y aproximadamente 70 nm, o entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 60 nm, o entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 50 nm, o entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 40 nm, o entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 30 nm.

40 En algunos aspectos, el poro tiene una forma sustancialmente redonda. "Sustancialmente redonda", tal como se emplea en la presente, se refiere a una forma que en al menos aproximadamente 80 o 90% está en forma de un cilindro. En algunas realizaciones, el poro tiene una forma cuadrada, rectangular, triangular, oval, o hexangular.

45 Cada uno de los poros (111 y 112) independientemente tiene una profundidad. En un aspecto, cada poro tiene una profundidad de al menos aproximadamente 0,3 nm. Como alternativa, cada poro tiene una profundidad que es de al menos aproximadamente 0,6 nm, 1 nm, 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 11 nm, 12 nm, 13 nm, 14 nm, 15 nm, 16 nm, 17 nm, 18 nm, 19 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, o 90 nm.

En un aspecto, cada poro tiene una profundidad que no es mayor que aproximadamente 100 nm. Como alternativa, la profundidad no es mayor que aproximadamente 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 o 10 nm.

50 En un aspecto, el poro tiene una profundidad que está entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm, o como alternativa, entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 80 nm, o entre aproximadamente 3 nm y aproximadamente 70 nm, o entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 60 nm, o entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 50 nm, o entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 40 nm, o entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 30 nm.

55 En un aspecto, los poros están separados entre sí por una distancia que está entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 1000 nm. En un aspecto, la distancia es de al menos aproximadamente 10 nm, o como alternativa, de al menos aproximadamente 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 150

nm, 200 nm, 250 nm, o 300 nm. En otro aspecto, la distancia no es mayor que aproximadamente 1000 nm, 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, o 100 nm. En otro aspecto, la distancia está entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 800 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 700 nm, entre aproximadamente 40 nm y aproximadamente 500 nm, o entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 300 nm.

Los dos poros pueden disponerse en cualquier posición, con la condición de que permitan una comunicación fluida entre las cámaras y de que tengan el tamaño y la distancia entre ellos prescritos. En un aspecto, los poros se colocan de modo que no exista un bloqueo directamente entre ellos. Además, en un aspecto, los poros son sustancialmente coaxiales, tal como se ilustra en **FIG. 1(I)**.

En un aspecto, el dispositivo, a través de los electrodos en las cámaras, está conectado a uno o más suministros de energía. En algunos aspectos, el suministro de energía está formado por un pinzamiento de voltaje o un pinzamiento zonal de membrana para suministrar el voltaje a través de cada poro, que también puede medir independientemente la corriente a través de cada poro. A este respecto, el suministro de energía puede ajustar la cámara intermedia a una tierra común para ambas fuentes de voltaje. En un aspecto, el suministro de energía se configura para proporcionar un primer voltaje entre la cámara superior (por ejemplo, la cámara A en **FIG. 1(I)**) y la cámara intermedia (por ejemplo, la cámara B en **FIG. 1(I)**), y un segundo voltaje entre la cámara intermedia y la cámara inferior (por ejemplo, la cámara C en **FIG. 1(I)**).

En algunos aspectos, el primer voltaje y el segundo voltaje son ajustables independientemente. En un aspecto, la cámara intermedia se ajusta para que se conecte a tierra con relación a los dos voltajes (ilustrado en **FIG. 1(I-III)**). En un aspecto, la cámara intermedia comprende un medio para proporcionar conductancia entre cada uno de los poros y el electrodo en la cámara intermedia. En un aspecto, la cámara intermedia comprende un medio para proporcionar una resistencia entre cada uno de los poros y el electrodo en la cámara intermedia. Resulta útil mantener dicha resistencia lo suficientemente pequeña, con relación a las resistencias de los nanoporos, para desacoplar los dos voltajes y corrientes a través de los poros, lo cual ayuda al ajuste independiente de los voltajes.

El ajuste de los voltajes puede emplearse para controlar el movimiento de las partículas cargadas en las cámaras. Por ejemplo, cuando ambos voltajes se ajustan en la misma dirección, una partícula de carga apropiada puede moverse desde la cámara superior hacia la cámara intermedia y hacia la cámara inferior, o al revés, de modo secuencial. De otra forma, una partícula cargada puede moverse desde la cámara superior o inferior hacia la cámara intermedia y mantenerse ahí.

El ajuste de los voltajes en el dispositivo puede ser particularmente útil para controlar el movimiento de una molécula grande, tal como un polímero cargado, que sea lo suficientemente larga como para cruzar ambos poros al mismo tiempo. En este aspecto, el movimiento y la velocidad de movimiento de la molécula puede controlarse mediante la magnitud relativa y la dirección de los voltajes, aspecto que se describirá más a fondo a continuación.

El dispositivo puede contener materiales adecuados para contener muestras de líquidos, en particular muestras biológicas y/o materiales adecuados para la nanofabricación. En un aspecto, estos materiales incluyen materiales dieléctricos tales como, pero sin limitarse a silicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, grafeno, nanotubos de carbono, TiO₂, HfO₂, Al₂O₃, u otras capas metálicas, o cualquier combinación de estos materiales. Una única lámina de grafeno forma una membrana con un espesor de aproximadamente 0,3 nm, y puede utilizarse como la membrana que porta el poro, por ejemplo.

Los dispositivos que son microfluídicos y que albergan aplicaciones de chips microfluídicos de dos poros pueden fabricarse mediante una diversidad de medios y métodos. Para un chip microfluídico formado por dos membranas paralelas, ambas membranas pueden ser taladradas simultáneamente por un único haz para formar dos poros concéntricos, aunque también es posible utilizar haces diferentes a cada lado de las membranas en concierto con cualquier técnica de alineamiento adecuada. En términos generales, el alojamiento asegura la separación sellada de las cámaras A-C. En un aspecto, el alojamiento proporciona una resistencia de acceso mínima entre los electrodos de voltaje (dos fuentes y una tierra) y los nanoporos, para asegurar que cada voltaje se aplica principalmente a través de cada poro.

En un aspecto, **FIG. 2** muestra una vista externa de otra realización del dispositivo. En **FIG. 2**, el dispositivo contiene un chip microfluídico (denominado "chip de núcleo dual") formado por dos membranas paralelas conectadas por espaciadores. Cada membrana contiene un poro (no se muestra) que ha sido taladrado por un único haz a través del centro de la membrana. Además, el dispositivo preferiblemente tiene un alojamiento de Teflon[®] para el chip. El alojamiento asegura la separación sellada de las cámaras A-C y proporciona una resistencia de acceso mínima para el electrolito para asegurar que cada voltaje se aplica principalmente a través de cada poro.

De modo más específico, las membranas que portan los poros puede fabricarse con rejillas TEM ("transmission electron microscopy", microscopía de transmisión de electrones) con ventanas de silicio de 5-100 nm de espesor, nitruro de silicio o dióxido de silicio. Pueden utilizarse espaciadores para separar la membrana, empleando un aislante (SU-8, fotorresistente, óxido de PECVD, óxido de ALD, alúmina ALD) o un material de un metal evaporado (Ag, Au, Pt), y que ocupan un pequeño volumen dentro de la porción, por lo demás acuosa, de la cámara B entre las

membranas. El dispositivo portador se asienta en un baño acuoso que comprende la fracción volumétrica mayor de la cámara B. Las cámaras A y C son accesibles a través de canales de diámetro mayor (para una resistencia de acceso baja) que conducen a los sellos de la membrana.

5 Puede utilizarse un haz de electrones o de iones enfocado para taladrar los poros a través de la membrana, alineándolos de modo natural. Los poros también puede ser esculpidos (encogidos) hasta un tamaño menor aplicando un enfoque correcto del haz a cada capa. También puede utilizarse cualquier método de taladrado de nanoporos individuales para taladrar el par de poros en las dos membranas, tomando en cuenta la profundidad de taladrado posible para un método concreto y el espesor de las membranas. También es posible pretaladrar un microporo hasta una profundidad prescrita y después un nanoporo a través del resto de las membranas, para afinar aún más los espesores de las membranas.

10 En otro aspecto, la inserción de nanoporos biológicos en nanoporos en estado sólido para formar un poro híbrido puede utilizarse en cualquiera o ambos nanoporos en el método de dos poros (Hall *et al.*, Nat. Nanotech., 5(12):874-877, 2010). El poro biológico puede aumentar la sensibilidad de las mediciones de la corriente iónica, y es útil cuando se van a capturar y controlar solo polinucleótidos monocatenarios en el dispositivo de dos poros, por ejemplo, para la secuenciación.

Control del movimiento de las moléculas con un dispositivo de dos poros

20 En virtud de los voltajes presentes en los poros del dispositivo, las moléculas cargadas pueden moverse a través de los poros entre las cámaras. La velocidad y la dirección del movimiento pueden controlarse mediante la magnitud y la dirección de los voltajes. Además, debido a cada uno de los dos voltajes puede ajustarse independientemente, el movimiento y la velocidad de una molécula cargada puede controlarse con precisión en cada cámara.

25 Por ejemplo, el dispositivo puede utilizarse para mezclar dos moléculas con carga positiva de una manera controlada. Para este fin, la primera molécula primero se carga en la cámara superior y la segunda en la cámara inferior. Un primer voltaje a través del primer puerto puede inducir el movimiento de la primera molécula hacia la cámara intermedia desde la cámara inferior. De forma similar, un segundo voltaje, en la dirección opuesta al primer voltaje, puede inducir el movimiento de la segunda molécula hacia la cámara intermedia desde la cámara inferior. Debido a las direcciones opuestas de los voltajes, ambas moléculas se mantendrán en la cámara intermedia de forma que reaccionan entre sí. Además, ajustando las magnitudes relativas de los voltajes puede afinarse con precisión la velocidad de influjo de cada una de las moléculas, lo cual conduce a una reacción controlada.

30 Otro ejemplo se refiere a un polímero cargado, tal como un polinucleótido, que tenga una longitud que sea mayor que la distancia combinada que incluye la profundidad de ambos poros más la distancia entre los dos poros. Por ejemplo, un ADNbc de 1000 pb tiene una longitud de aproximadamente 340 nm y sería sustancialmente más largo que los 40 nm que miden dos poros con una longitud de 10 nm separados por 20 nm. En una primera etapa, el polinucleótido se carga en la cámara superior o en la inferior. En virtud de su carga negativa bajo condiciones fisiológicas (aproximadamente pH 7,4), el polinucleótido puede moverse a través de un poro sobre el cual se aplica un voltaje. Por tanto, en una segunda etapa, se aplican dos voltajes en la misma dirección y con las mismas magnitudes o magnitudes similares, a los poros para inducir el movimiento del polinucleótido a través de ambos poros secuencialmente.

35 Cuando el polinucleótido alcanza el segundo poro, uno o ambos voltajes pueden cambiarse. Puesto que el polinucleótido es más largo que la distancia que cubren ambos poros, cuando el polinucleótido alcanza el segundo poro también se encuentra en el primer poro. Por tanto, un cambio rápido en la dirección del voltaje en el primer poro generará una fuerza que arrastre al polinucleótido alejándolo del segundo poro (ilustración en **FIG. 1(III)**).

40 Si, en este punto, la magnitud de la fuerza inducida por el voltaje en el primer poro es menor que la de la fuerza inducida por el voltaje en el segundo poro, entonces el polinucleótido continuará atravesando ambos poros hacia el segundo poro, pero a una velocidad menor. A este respecto, se apreciará con facilidad que la velocidad y la dirección del movimiento del polinucleótido pueden ser contraladas por las direcciones y las magnitudes de ambos voltajes. Tal como se describirá más a fondo a continuación, este control fino del movimiento tiene amplias aplicaciones.

45 Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona un método para controlar el movimiento de un polímero cargado a través de un poro. El método supone (a) cargar una muestra que comprende un polímero cargado en una de la cámara superior, la cámara intermedia o la cámara inferior del dispositivo de cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el dispositivo está conectado a un suministro de energía para proporcionar un primer voltaje entre la cámara superior y la cámara intermedia, y un segundo voltaje entre la cámara intermedia y la cámara inferior; (b) ajustar un primer voltaje inicial y un segundo voltaje inicial, de modo que el polímero se mueva entre las cámaras, situando con ello al polímero a través del primer y del segundo poro; y (c) ajustar el primer voltaje y el segundo voltaje de modo que ambos voltajes generen una fuerza para arrastrar al polímero cargado de la cámara intermedia (modo de competición de voltaje), en el que los dos voltajes son diferentes en magnitud, bajo condiciones controladas, de modo que el polímero cargado se mueva a través de ambos poros en cualquier dirección y de una manera controlada.

Para establecer el modo de competición de voltaje en la etapa (c), debe determinarse la fuerza relativa ejercida por cada voltaje en cada poro para cada dispositivo de dos poros utilizado, y esto puede realizarse con experimentos de calibración observando la influencia de diferentes valores de voltaje sobre el movimiento del polinucleótido (el movimiento puede medirse detectando características de localización conocida y detectables en el polinucleótido, detallándose más adelante en este documento provisional ejemplos de dichas características). Si las fuerzas son equivalentes en cada voltaje común, por ejemplo, entonces si se emplea el mismo valor de voltaje en cada poro (con la polaridad común en las cámaras superior e inferior en relación con la cámara intermedia conectada a tierra) se crea un movimiento neto cero en ausencia de agitación térmica (la presencia e influencia del movimiento browniano se analiza a continuación). Si las fuerzas no son equivalentes en cada voltaje común, entonces para lograr el equilibrio de las fuerzas es necesario identificar y usar un voltaje mayor en el poro que tenga una fuerza más débil en el voltaje común. Es necesaria la calibración para el modo de competición de voltaje para cada dispositivo de dos poros, y sería necesaria para moléculas o polímeros cargados específicos en los que las características que pasan a través de cada poro influyan en la fuerza.

En un aspecto, la muestra se carga en la cámara superior y el primer voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero cargado de la cámara superior hacia la cámara intermedia, y el segundo voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero de la cámara intermedia hacia la cámara inferior. De forma similar, la muestra puede cargarse primero en la cámara inferior.

En otro aspecto, la muestra se carga en la cámara intermedia y el primer voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero cargado de la cámara intermedia hacia la cámara superior, y el segundo voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero cargado de la cámara intermedia hacia la cámara inferior.

En algunos aspectos, el polímero cargado es un polinucleótido o un polipéptido. En un aspecto particular, el polímero cargado es un polinucleótido. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen ADN bicatenario, ADN monocatenario, ARN bicatenario, ARN monocatenario, e híbridos de ADN-ARN.

En un aspecto, el primer voltaje y el segundo voltaje ajustados en la etapa (c) son de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 10.000 veces tan altos, en magnitud, como la diferencia entre los dos voltajes. Por ejemplo, los dos voltajes son de 90 mV y 100 mV, respectivamente. La magnitud de los voltajes (aproximadamente 100 mV) es aproximadamente 10 veces la diferencia entre ellos, 10 mV. En algunos aspectos, la magnitud de los voltajes es al menos aproximadamente 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 veces, 7000 veces, 8000 veces o 9000 veces tan alta como la diferencia entre ellos. En algunos aspectos, la magnitud de los voltajes no es mayor aproximadamente 10000 veces, 9000 veces, 8000 veces, 7000 veces, 6000 veces, 5000 veces, 4000 veces, 3000 veces, 2000 veces, 1000 veces, 500 veces, 400 veces, 300 veces, 200 veces, o 100 veces tan alta como la diferencia entre ellos.

En un aspecto, los ajustes a tiempo real o en línea del primer voltaje y el segundo voltaje en la etapa (c) se realizan mediante un control activo o un control retroalimentado utilizando un hardware y un software especializado, a una frecuencia de base de hasta cientos de megahertzios. El control automático del primer o segundo voltaje o ambos se basa en la retroalimentación de las mediciones de primera o segunda corriente iónica o de ambas.

Análisis de las moléculas con un dispositivo de dos poros

El dispositivo de dos poros de la presente descripción puede utilizarse para realizar análisis de moléculas o partículas que se mueven o que son mantenidas dentro del dispositivo en virtud de los voltajes controlados aplicados en los poros. En un aspecto, el análisis se realiza en cualquiera o ambos poros. Cada sistema de pinzamiento de voltaje o de pinzamiento zonal de membrana mide la corriente iónica a través de cada poro, y esta corriente medida se emplea para detectar la presencia de las moléculas o partículas cargadas que están pasando o cualquier característica asociada con una molécula o partícula cargada que esté pasando.

Tal como se indicó anteriormente, un polinucleótido puede cargarse en ambos poros mediante dos voltajes que tengan la misma dirección. En este ejemplo, después de que la dirección del voltaje aplica en el primer poro se haya invertido y la nueva fuerza inducida por el voltaje sea ligeramente menor, en magnitud, que la fuerza inducida por el voltaje aplicada en el segundo poro, el polinucleótido continuará moviéndose en la misma dirección, pero a una velocidad marcadamente inferior. A este respecto, el amplificador que suministra el voltaje a través del segundo poro también mide la corriente que pasa a través del segundo poro, y la corriente iónica entonces determina la identificación de un nucleótido que esté pasando a través del poro, puesto que el paso de cada diferente nucleótido genera una señal de corriente diferente (por ejemplo, basada en los desplazamientos en la amplitud de la corriente iónica). Por consiguiente, la identificación de cada nucleótido en el polinucleótido revela la secuencia del polinucleótido.

En algunos aspectos, el transporte controlado repetido para resecuenciar un polinucleótido mejora aún más la calidad de la secuenciación. Cada voltaje se alterna a una magnitud cada vez mayor para el transporte controlado en cada dirección. También se contempla que las dos corrientes a través de los dos poros puedan correlacionarse para mejorar la precisión. Se contempla que el movimiento browniano pueda provocar fluctuaciones en el

movimiento de una molécula, que afectan al transporte controlado de la molécula. Sin embargo, este efecto puede minimizarse o evitarse, por ejemplo, mediante el transporte controlado repetido durante la secuenciación del ADN y promediando las mediciones de secuenciación. Además, se contempla que el impacto del movimiento browniano sobre el movimiento controlado de moléculas grandes, tales como polinucleótidos y polipéptidos, sea insignificante, en particular cuando las fuerzas en competencia están separando las moléculas grandes, lo cual genera tensión dentro de la molécula.

Este método proporciona una solución fácil a problemas que no han sido resueltos en la técnica anterior.

Por ejemplo, se sabe que existen dos obstáculos en competencia para lograr el transporte controlado y la detección precisa necesarios para la secuenciación con nanoporos. Uno es que se necesita un voltaje relativamente alto, en el poro, para suministrar la suficiente sensibilidad de secuenciación. Por otra parte, unos voltajes altos provocan que el polinucleótido atraviese con rapidez el poro, sin que haya tiempo suficiente para la identificación de cada nucleótido.

De modo más específico, la plataforma de secuenciación con nanoporos requiere que la velocidad de paso del polinucleótido a través del poro esté controlada a 1 ms/nucleótido (nt) o más lenta, y que al mismo tiempo se genere una corriente sensible a la secuencia. Esto requiere una señal frente al ruido lo suficientemente alta (es mejor un alto voltaje), pero un movimiento suficientemente lento de la molécula a través del poro para asegurarse de que las mediciones estén dentro del ancho de banda de medición (es mejor un voltaje bajo). En las aplicaciones de poros individuales, la velocidad del polinucleótido es proporcional al voltaje, de forma que un voltaje mayor es mejor para detectar, pero peor para reducir la velocidad del polinucleótido: las velocidades son de 1 μ s/nt y más rápidas (>1000 veces demasiado rápidas) en voltajes que estimulan la captura del polinucleótido. Por otra parte, unos voltajes menores reducen la actuación de detección, y también aumentan la contribución relativa de las fluctuaciones en velocidad provocadas por el movimiento browniano que socavan la precisión de la lectura.

Además de los descritos en la presente, en la actualidad no existen métodos para intentar solucionar estos obstáculos que no impliquen el uso de enzimas o instrumentos ópticos, que solo sirven para las técnicas de nanoporos especializadas.

Se han propuesto varias estrategias para intentar solucionar el problema asociado con la falta de capacidad de detección y con voltajes bajos. Una es construir nanoporos biológicos para mejorar su sensibilidad. Otra es emplear membranas de grafeno que, como una lámina individual, son más delgadas que la distancia entre los nucleótidos en el ADNmc. Otra es el uso de una corriente auxiliar medida muy cerca del nanoporo (por ejemplo, corrientes tuneladoras).

Se han ensayado los nanoporos biológicos en la primera estrategia. El nanoporo de α -hemolisina es el poro biológico que se emplea con más frecuencia en investigación. Los estudios han demostrado que la α -hemolisina puede resolver sustituciones de nucleótidos individuales en homopolímeros y restos abásicos (1',2'-didesoxi) dentro de ADN que, por lo demás, están formados por nucleobases. Sin embargo, la sensibilidad de nucleótidos individuales no es posible en ADN heterodiméricos con α -hemolisina de tipo salvaje ("wild-type", WT), ya que la corriente iónica se ve influida por aproximadamente 10 nucleótidos en el canal. Se ha empleado la modificación de proteínas de α -hemolisina para mejorar su sensibilidad para el análisis y la secuenciación de ADN. Uno de estos poros mutantes emplea α -hemolisina con un adaptador molecular unido covalentemente (Clarke *et al.*, Nat. Nanotech., 4(4):265-270, 2009) que es capaz de discriminar entre las cuatro moléculas de nucleósido 5'-monofosfato con alta precisión. Sin embargo, este poro mutante no parece presentar sensibilidad para la secuenciación de ADNmc heteroméricos intactos que pasan a través del poro.

Otro ejemplo de poro biológico es MspA, que tiene forma de embudo que enfoca la sensibilidad de la corriente iónica en el fondo del canal. Además, se puede conseguir la reducción de la velocidad del ADN a través de MspA y α -hemolisina empleando enzimas. Tal como se muestra en la figura 1 de Manrao *et al.*, Nature Biotechnology, 30:349-53, 2012, la reducción de la velocidad del ADN se logra con la enzima encaramada la nanoporo MspA. Sin embargo, esto provoca una duración de la detección no determinista, lecturas repetidas inducidas por reversión de la trayectoria, e incapacidad para detectar regiones homopoliméricas. El mecanismo de la translocación de ADN mediada por la ϕ 29 polimerasa ha sido desarrollado en Cherf *et al.*, Nat. Biotech., 30(4):344-348, 2012) sobre la α -hemolisina y se ha aplicado en el nanoporo MspA más sensible (Manrao *et al.*, Nature Biotechnology, 30:349-353, 2012). Las velocidades discontinuas de la translocación catalizada por polimerización son de 2,5-40 nt/s, que cumplen con los requisitos para la reducción de velocidad del ADN. Sin embargo, aunque las enzimas en los bioporos pueden reducir la velocidad de translocación, no existe control sobre el tiempo de permanencia de cada nucleótido, lo cual dificulta el rastreo ciego de repeticiones y la diferenciación de pausas largas en una lectura de nucleótidos individuales. En términos de la sensibilidad, tal como se muestra en la figura 3 de Manrao *et al.*, Nature Biotechnology, 30:349-353, 2012, la lectura de un molde de ADN repetitivo puede lograrse con ϕ 29 sobre MspA. La figura (3a) muestra un ejemplo de rastreo para un molde de ADN compuesto por trinucleótidos CAT repetidos, con la excepción de un triplete CAG en mitad de la secuencia. El * representa "pasadores" detectados (mediante análisis humano) como transiciones repetidas entre dos niveles, que son intrínsecos al método de control basado en enzimas e incurrir en errores de lectura. La figura (3b) también muestra la idealización de (3a), estando los promedios de las corrientes alineados con la secuencia de ADN conocida y eliminando la disparidad de mediciones medidas mostradas en (3a). La idealización muestra un patrón repetido de tres niveles interrumpido por la única

sustitución dG. Cuatro niveles resultan afectados por la única dG, estando las desviaciones mayores más cerca de la sustitución, lo cual sugiere que la corriente residual se ve principalmente afectada por aproximadamente 4 nucleótidos. El hecho de que la corriente iónica a través de MspA se vea influenciada por aproximadamente 4 nucleótidos más próximos a la abertura limitante añade una complejidad considerable a la identificación de la secuencia. Aunque, de modo ideal, se podría construir un banco de amplitudes de corriente diferenciadas que cartografié cada una de las $4^4 = 256$ combinaciones, tal como se sugiere en la técnica, este banco sería difícil de lograr. La razón es que la identificación de las transiciones de etapa en los registros de la corriente del canal requiere una proporción de señal al ruido (SNR) de al menos 2 como lo métodos de semiamplitud ($SNR \geq 1,5$ para los métodos basados en Markov). Con un ruido RMS de 0,5 pA en los anchos de banda de registro, los desplazamientos de las amplitudes deben ser al menos 1 pA para conseguir la SNR requerida, lo cual produce niveles detectables de solo aproximadamente 40 dentro del intervalo de amplitud de 40 pA con MspA (o como máximo de 53 niveles a SNR 1,5). Además, se observarán menos de 40 niveles, puesto que el intervalo no se utilizará de modo uniforme, y aunque una posterior filtración podría reducir el ruido para añadir discriminación de amplitud, esto también daría como resultado dejar pasar una mayor cantidad de transiciones de movimiento de ADNmc más rápidas que están presentes.

En la actualidad, no existen nanoporos para los cuales una detección de la corriente iónica pueda proporcionar la sensibilidad de un nucleótido individual para la secuenciación de ácidos nucleicos. No obstante, las mejoras en la sensibilidad de los poros biológicos y los poros en estado sólido (grafeno) son campos de investigación activos que se están desarrollando. Una cuestión es que la detección de la corriente iónica no permite el rastreo directo del avance a través de regiones homopoliméricas (repeticiones de bases), puesto que no existe una señal diferenciada por nucleótido del movimiento de ADNmc homopoliméricos a través del poro. Por ejemplo, las repeticiones del rastreo son fundamentales, puesto que se han implicado ciertas delecciones e inserciones de repeticiones de mononucleótidos específicos (7, 9 nt) dentro del ADN mitocondrial humano en varios tipos de cánceres (Sánchez-Céspedes, *et al.*, *Cancer Research*, 61(19):7015-7019, 2001). Aunque las enzimas en los bioporos pueden reducir la velocidad de translocación, no se puede controlar el tiempo de permanencia de cada nucleótido. Por otra parte, si se emplea una velocidad de transporte constante en el control de los dos poros se eliminan las pausas no deterministas y puede realizarse un cálculo preciso de las longitudes de las repeticiones. Volver a leer la sección repetida muchas veces también puede mejorar los errores de cálculo e identificar los límites de error, y esto puede realizarse sin tener que invertir la química de polimerización provocada por las enzimas.

Un estudio reciente ha demostrado que con un único nanoporo no pueden lograrse unas velocidades reducidas simplemente reduciendo el voltaje (Lu *et al.*, *Biophysical Journal*, 101(1):70-79, 2011). Por el contrario, a medida que se reduce el voltaje, las velocidades de un ADN monocatenario (ADNmc) se hacen más aleatorias (incluyendo la reversión de la trayectoria), puesto que el movimiento browniano contribuye aún más a las fluctuaciones en la velocidad. Este estudio también demuestra que es necesaria una fuerza de voltaje alta para eliminar las fluctuaciones en la velocidad inducidas por el movimiento browniano que podrían confundir las mediciones de secuenciación, incluso cuando se emplea un detector idealizado de nanoporos sensible a un único nucleótido.

El método de secuenciación proporcionado en la presente descripción, basado en un dispositivo de dos poros, proporciona una solución fácil a estos problemas y otras ventajas frente a los métodos existentes. En concreto con uno o dos poros que tengan la sensibilidad suficiente para la secuenciación, a alto o bajo voltaje, el control de los dos poros resuelve el problema del control de la velocidad de secuenciación de las aplicaciones de nanoporos individuales. Estos poros pueden incluir poros biológicos alojados en sustratos en estado sólido, poros biológicos en membranas formadas a través de sustratos en estado sólido, o poros en estado sólido (por ejemplo, en grafeno, silicio u otros sustratos). En un aspecto, puede utilizarse una enzima, tal como phi29, en un poro biológico, tal como MspA, en uno o ambos poros, con altos voltajes utilizados para generar señales grandes para la secuenciación, y un voltaje diferencial bajo que genera una fuerza sobre cada enzima que es suficiente para mantener a la enzima en una posición por encima de cada poro y permite el movimiento del ADN catalizado por polimerización, pero que no sea tan grande como para detener o disociar las enzimas. Esta configuración puede mejorar los métodos en Cherf *et al.*, *Nat. Biotech.*, 30(4):344-348, 2012 y Manrao *et al.*, *Nature Biotechnology*, 30:349-353, 2012, intensificando significativamente la señal de medición y permitiendo que los dos poros lean una hebra de ADN al mismo tiempo.

Además, el método de la presente descripción puede generar un voltaje suficientemente alto en el poro para asegurar la sensibilidad de detección en el poro utilizando la detección de la corriente iónica. Resulta plausible que un voltaje alto suprima el movimiento browniano hasta un punto suficiente para asegurar una velocidad constante a través de cada poro, y que la configuración del ADN fuera de cada poro afecte a la energética del movimiento del ADN en cualquier dirección. Además, la competición de voltaje empleada en el método (**FIG. 1(III)**) puede afinarse con precisión, de modo que la molécula permanezca un tiempo suficiente en el poro para permitir el análisis de la molécula. Además, el presente método no necesita enzimas, instrumentos ópticos o uniones al ADN. Por tanto, el método proporciona corrientes de detección de alta proporción de señal al ruido a través del nanoporo, al mismo tiempo que regula la velocidad de transporte de la molécula, una capacidad que no es posible con aplicaciones de un único nanoporo.

El método puede utilizarse para identificar una composición de monómeros en un polímero cargado. En un aspecto, la unidad monomérica es un nucleótido cuando el polímero es un ADN o ARN monocatenario. En otro aspecto, la unidad monomérica puede ser una pareja de nucleótidos, cuando el polímero es bicatenario.

En un aspecto, el método puede utilizarse para identificar una modificación en el polímero, tal como una molécula unida a un monómero, en particular cuando la molécula unida está cargada. Sin embargo, no es necesario que la molécula unida esté cargada, puesto que incluso una molécula neutra puede cambiar la corriente iónica en virtud de su tamaño.

- 5 En otro aspecto, la modificación comprende la unión de una molécula al polímero. Por ejemplo, para una molécula de ADN, la molécula unida puede ser una proteína de unión al ADN, tal como RecA, NF- κ B y p53. En otro aspecto, la modificación es una partícula que se une a un monómero o fragmento concreto. Por ejemplo, el dispositivo puede detectar puntos cuánticos o marcadores fluorescentes unidos a un sitio del ADN concreto para la genotipificación o el cartografiado del ADN. Por consiguiente, el dispositivo de la presente descripción proporciona también una forma barata de genotipificación y cartografiado del ADN, sin limitación.

En un aspecto, el polímero está unido a un soporte sólido, tal como una esfera, en un extremo del polímero.

- También se proporciona, en una realización, un método para determinar la secuencia de un polinucleótido, que comprende: (a) cargar una muestra que comprende un polinucleótido en la cámara superior del dispositivo de cualquiera de las anteriores realizaciones, en el que el dispositivo está conectado a un suministro de energía para proporcionar un primer voltaje entre la cámara superior y la cámara intermedia, y un segundo voltaje entre la cámara intermedia y la cámara inferior, en el que el polinucleótido está unido opcionalmente a un soporte sólido en un extremo del polinucleótido; (b) ajustar un primer voltaje inicial y un segundo voltaje inicial de modo que el polinucleótido se mueva desde la cámara superior hacia la cámara intermedia y desde la cámara intermedia hacia la cámara inferior, situando con ello al polímero a través de ambos primer y segundo poro; (c) ajustar el primer voltaje y el segundo voltaje de modo que ambos voltajes generen una fuerza para arrastrar al polinucleótido de la cámara intermedia, en el que los dos voltajes son diferentes en magnitud, bajo condiciones controladas, de modo que el polinucleótido se mueva a través de ambos poros en una dirección y de una manera controlada. y (d) identificar cada nucleótido del polinucleótido que pasa a través de uno de los poros, mediante la medición de una corriente iónica a través del poro cuando el nucleótido pasa a través de ese poro.

25 Ejemplos

La presente tecnología se define con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Para los expertos en la técnica será evidente que pueden realizarse muchas modificaciones, en la ejecución y los métodos, sin apartarse del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Captura y control de moléculas de ADNbc individuales en los poros

- 30 Este ejemplo demuestra que la captura de ADN hacia el interior de cada poro en un dispositivo de dos poros puede detectarse con facilidad como un desplazamiento en la corriente iónica de cada poro independiente medida.

Este ejemplo demuestra la captura con poro dual empleando ADNbc con y sin una esfera unida a un extremo. También pueden estudiarse experimentos con ADNmc unido a esferas.

- 35 Tras la captura y el alojamiento del ADN, el voltaje del poro más cercano a la esfera (V1, **FIG. 1(I)**) en el caso de la captura en la cámara A) puede invertirse y aumentarse hasta que la fuerza competidora sobre el ADN le arrastre de nuevo hacia la cámara A. La corriente iónica en cualquiera de los poros puede detectar con facilidad la captura y la salida del ADN durante el experimento.

- 40 Cuando se emplea una esfera, la esfera tendrá un tamaño apropiado que evite que la esfera pase a través de cualquiera o de ambos poros. En la técnica se han desarrollado métodos para asegurar una proporción de esfera-ADN de 1 a 1. Por ejemplo, puntos cuánticos revestidos con estreptavidina monovalentes (QD; QD655, Invitrogen) conjugados con dúplex de ADN biotinilado (o ADNmc) pueden proporcionar esferas con un intervalo de diámetro de 20-30 nm, y se pueden proporcionar esferas más grandes (30-100 nm) utilizando partículas de oro o látex. Puede considerarse la influencia de la esfera sobre la hidrodinámica y la carga, puesto que se relaciona con la velocidad de captura, durante el diseño de los experimentos.

- 45 Sin las esferas, el ADNbc pasa a través de un poro a aproximadamente 0,1 ms/kpb. Pueden utilizarse ADN con longitudes de 500 pb y 4 kpb, y moléculas de ADNbc de la fase λ (aproximadamente 48 kpb). Las muestras de ADN pueden transportarse desde la cámara A hacia el interior de ambos poros utilizando una polaridad de voltaje común para cada poro para estimular la captura desde la cámara A y el paso a través de la cámara B hacia la cámara C (**FIG. 1(I)**). La gran longitud de persistencia del ADNbc (un Kuhn de longitud es 100 nm) asegura que el segmento de ADN dentro de cada poro probablemente esté totalmente extendido y con forma de varilla. El voltaje y la concentración iónica pueden variar para identificar las velocidades de captura adecuadas. También pueden utilizarse diferentes concentraciones iónicas tamponadas en cada cámara para potenciar o alterar las velocidades de captura y los valores de desplazamiento de la conductancia que registran la presencia de ADN en cada poro.

- 55 Empleando unos diámetros de nanoporos de 10 nm y mayores se minimiza la interacción (por ejemplo, fricción y pegado) entre el ADNbc y las paredes del nanoporo. Para poros más grandes, aunque el ADNbc puede capturarse en una configuración no plegada y plegada, la configuración de una sola fila (desplegada) resulta más probable a

voltajes mayores y con ADNbc más cortos (≤ 3 kpb). Para una distancia entre poros de 500 nm o menor, se contempla que la probabilidad de una captura de poro dual, después de la captura en el primer poro (entre las cámaras A y B) sea muy alta, para voltajes de al menos 200 mV en KCl 1 M.

5 Se ha calculado que la distancia radial dentro de la cual la influencia del voltaje domina la difusión térmica y conduce a la captura con mayor probabilidad es de al menos 900 nm (mayor que la distancia entre poros) para una gama de tamaños de poro (diámetro de 6-15 nm), voltajes (120-500 mV), y con ADNbc con una longitud de al menos 4 kpb (Gershow y Golovchenko, *Nature Nanotechnology*, 2:775-779, 2007). Estos descubrimientos apoyan la noción de que la captura con poro dual rápida de ADNbc, después de la captura en un único poro (primera) del ADNbc, tenga una alta probabilidad.

10 La captura y el control del ADN a través de los dos poros puede mejorar con algoritmos a tiempo real y hardware de control activo. Los inventores han desarrollado un hardware/software de control activo para el control del ADN. Véase, por ejemplo, Gyrfas *et al.*, *Biophys. J.*, 100:1509-1516, 2011); Wilson *et al.*, *ACS Nano.*, 3(4):995-1003, 2009; y Benner *et al.*, *Nat. Nanotech.*, 2(11):718-724, 2007. Un software útil es el software LabVIEW (versión 8, National Instruments, Austin, TX), aplicado en un sistema FPGA (matriz de límite programable por campo) (PCI-7831R, National Instruments)). El FPGA mencionado puede controlar hasta 4 amplificadores simultáneamente. Además, el sistema de adquisición de datos Axon Digidata 1440A Data Acquisition System empleado para digitalizar y cargar datos a un PC tiene 16 canales de entrada, que son suficientes para registrar el voltaje y la corriente de hasta 8 amplificadores en paralelo. Otros sistemas que funcionen a tiempo real en concierto con un hardware/software para la medición y el control a tiempo real también pueden utilizarse para controlar los amplificadores y para digitalizar y cargar los datos.

15 Los inventores también han desarrollado un amplificador de pinzamiento de voltaje de ruido bajo denominado "Nanoclamp," (Kim *et al.*, *IEEE Trans. On Biom. Circ. And Syst.*, en impresión, mayo de 2012; Kim *et al.*, *Elec. Lett.*, 47(15):844-846, julio de 2011; y Kim *et al.*, *Proceedings of the IEEE International SoC Design Conference (ISODC)*, noviembre de 2010) para funcionalizar y optimizar el uso de uno o más nanoporos en dispositivos de huella pequeña y múltiples canales. Puede utilizarse cualquier otro amplificador de pinzamiento de voltaje o de pinzamiento zonal de membrana de mesa, o un amplificador de pinzamiento de voltaje o de pinzamiento zonal de membrana integrado para el control y la medición de los dos poros.

20 Para una diversidad de materiales y diámetros de poro en estado sólido, 0,1-10 kpb tarda aproximadamente 1 ms en translocar. Con un amplificador controlado con FPGA se puede detectar la captura e iniciar el control del voltaje competidor dentro de 0,020 ms, mucho más rápido que 1 ms de tiempo de paso total de ADN de 1 kpb; así, también es muy probable que el método de control se active antes de que el ADN escape (sin unión a una esfera). Como demostración del control, el tiempo hasta la salida de la molécula de los poros y su dirección puede demostrarse como una función de la magnitud y la diferencia entre los voltajes competidores (**FIG. 1(III)**). En los experimentos con un único poro, se observan experimentalmente grandes fluctuaciones en la velocidad de ADNbc largos (≥ 1 kpb) a través del poro, y estas fluctuaciones son demasiado grandes como para ser atribuidas al movimiento browniano. En Lu, *et al.*, *Biophysical Journal*, 101(1):70-79, 2011, se estableció el modelo de que la fuente dominante de fluctuaciones de la velocidad netas (es decir, la longitud del ADN dividido entre el tiempo de paso total) es debida al arrastre viscoso inducido por las porciones afectadas por el voltaje del ADN que aún no están en el poro, además de la porción en el poro, en donde se extiende la región de atracción del voltaje. El modelo se corresponde con los datos experimentales bastante bien. De forma notable, si el centro de la masa del ADNbc es colineal con el poro en la captura, la velocidad neta es mayor, pero si no está alineado con el poro, la velocidad neta es más lenta. Cuando se acoplan voltajes competidores en el dispositivo de dos poros, las velocidades del ADNbc no se verán afectadas por la perturbación inducida por el arrastre viscoso, a menos que la diferencia de voltaje sea suficientemente alta. La razón es que, después de la captura del ADNbc a través de ambos poros y de haber acoplado el voltaje competidor, el ADNbc entre los poros estará totalmente extendido y en forma de varilla, y por tanto no puede implicarse en la creación de estructuras cerca de ninguna de las entradas al interior del poro. Por otra parte, las estructuras de ADNbc en los lados exteriores de los poros están siendo constantemente empujadas por cada voltaje del poro local alejándolas del canal intermedio, y así es menos probable que confundan la cinética de entrada al poro. Esta estructura puede afectar a la cinética de transporte controlado y pueden utilizarse experimentos de calibración para cuantificarlo.

25 Es probable que la incertidumbre de la fuerza inducida por el movimiento del ADN transversal aleatorio sea mínima. Además, la fuerza del voltaje provoca un flujo electroosmótico (EOF) en la dirección opuesta al movimiento del ADN, lo cual provoca que el ADN se mueva más lentamente de lo que debería en ausencia del flujo contraiónico inducido. Puesto que las diferentes posiciones radiales de la molécula pueden producir diferentes campos EOF en el nanoporo, una cuestión sería si la densidad de carga eficaz y, por tanto, la fuerza conductora neta varía durante las fluctuaciones en la posición radial del ADN para inducir fluctuaciones en la velocidad. Se cree que la densidad de carga eficaz del ADN en KCl 1M es estable para una distancia de 1 nm o más entre la pared del poro y el ADN.

30 Además, los nanoporos de SiN tienen una carga de superficie negativa que intrínsecamente repele al ADN. Así, aunque la molécula sufra fluctuaciones en la posición radial, utilizando poros SiN con un diámetro mayor que unos pocos nanómetros es posible que cada valor de voltaje constante produzca una fuerza eficaz constante en cada uno de los poros y, así, una velocidad constante en la dirección de la fuerza mayor cuando se emplean dos voltajes

competidores en el sistema de dos poros. El tratamiento de otras superficies de materiales de poros puede producir unos efectos comparables a los de SiN.

La incertidumbre de la velocidad inducida por el movimiento del ADN traduccional aleatorio que es provocado por el movimiento browniano puede reducirse aumentando los voltajes competidores. Pueden realizarse experimentos para determinar si dicha reducción ocurrirá. Un estudio con un único nanoporo (Lu, *et al.*, Biophysical Journal, 101(1):70-79, 2011) apoya la idea de que si se aumentan las fuerzas competidoras se puede reducir la incertidumbre provocada por el movimiento browniano. El estudio analiza las fluctuaciones en la velocidad provocadas por el movimiento browniano, que aparecen en escales de tiempo rápidas (nanosegundos), y los errores de secuenciación que surgen de dichas fluctuaciones. Suponiendo la existencia de un detector de nucleótidos individuales hipotético e ideal (detección sin ruido en un ancho de banda > 22 MHz), el movimiento browniano por sí solo produce un error de lectura del 75%. El parámetro pertinente para predecir el error es $k_B T/F(0,34 \text{ nm})$, que es la proporción de energía térmica al trabajo realizado para translocar el ADN la distancia a entre nucleótidos (0,34 nm). En esta proporción, la fuerza $F = V\lambda$ es el voltaje V que conduce al ADN con una densidad de carga (0,2 e⁻/pb para ADNbc). Para el presente método de control, un aumento en el voltaje de 50X produce un error de lectura del 5%, y un voltaje mayor aumenta aún más los errores. Sin embargo, con un único poro, puesto que el promedio de la velocidad v es $F*d/(k_B T)$ con una constante de difusión d , la velocidad del ADN también aumenta con F , exigiendo unas demandas aún menos realistas con respecto al ancho de banda de la secuenciación.

Para mantener el ancho de banda de 22 MHz, un aumento del 50X en la fuerza con un único nanoporo debe corresponderse con un aumento en 50X en la viscosidad de la disolución para mantener la misma v . Sin embargo, en la práctica, un ancho de banda de 22 MHz ya es mucho mayor que el mostrado, o que promete mostrarse, en cualquier plataforma de nanoporos experimental para la secuenciación de nucleótidos individuales. Además, si se aumenta la viscosidad se puede frenar al ADN solo hasta 10X (Fologea, *et al.*, Nano Lett., 5(9):1734-1737, 2005) con nanoporos individuales. Con el uso de una plataforma de dos poros, cada voltaje puede mantenerse lo suficientemente alto, y esto puede suprimir las fluctuaciones provocadas por el movimiento browniano, mientras que el voltaje diferencial que determina la velocidad neta del ADN puede ajustarse para asegurar una velocidades de control que estén dentro de los anchos de banda de secuenciación reales (nominalmente 1 kHz). Un método alternativo para suprimir las fluctuaciones en la velocidad inducidas por el movimiento browniano es emplear un control retroalimentado. En un aspecto, con un ancho de banda de 10 kHz de la retroalimentación de corriente del segundo poro a la actuación del voltaje del primer poro a un ancho de banda de 10 kHz puede compensarse el movimiento browniano para controlar que las características detectables del ADN permanezcan dentro y cerca del segundo poro en estos kHz de anchos de banda de bucle cerrado. Esta capacidad es un análogo unidimensional de la trampa electrocinética antibrowniana (ABEL) que suprime el movimiento browniano en dos dimensiones espaciales y actúa mediante un empuje óptico de las esferas unidas a moléculas en Hz de anchos de banda de bucle cerrado (Wang y Moerner, ACS Nano, 5:5792-5799, 2011).

35 Ejemplo 2: Detección y localización de filamentos de RecA unidos a ADN

Este ejemplo demuestra que el dispositivo de dos poros puede utilizarse para cartografiar la unión de un ADNbc a una proteína de unión al ADN, y para proteínas que tienen o que no se unen a secuencias específicas.

Tal como se demostró en el ejemplo 1, las muestras de ADN pueden capturarse desde la cámara A. La proteína RecA cataliza un reacción de intercambio de hebra de ADN dependiente de ATP que aparea el ADN roto con regiones complementarias de ADN intacto. Utilizando un análogo de ATP poco hidrolizable, ATP γ S, los filamentos de RecA unidos a ADNbc son muy estables en condiciones de alta salinidad (por ejemplo KCl 1 M) cuando se ensamblan primero en concentración salina fisiológica. Como alternativa a ATP γ S, que se hidroliza lentamente, este ejemplo también puede utilizar ADP-AIF4 (tetrafluoruro de aluminio), que no sufre recambio en absoluto y hace que RecA se una con más fuerza al ADN.

45 Se ha demostrado la detección de filamentos de RecA unidos a ADN- λ a través de nanoporos de 20-30 nm (Kowalczyk *et al.*, Nano Lett., 10(1):324-328, 2010; Smeets *et al.*, Nano Lett., 9(9):3089-3095, 2009; y Hall *et al.* Nano Lett., 9(12):4441-4445, 2009], pero los filamentos <20 pb (6 o menos proteínas RecA) de longitud no pueden resolverse utilizando un único nanoporo, debido al acoplamiento entre la velocidad de translocación y la SNR de medición.

50 Los experimentos iniciales de este ejemplo emplean un ADN- λ unido y no unido a esferas que se ha expuesto a concentraciones variables de RecA, para generar un ADN que está casi no revestido, está parcialmente revestido y está totalmente revestido. Puede utilizarse el control a tiempo real de la corriente de cada poro para calibrar el avance del transporte controlado, y se correlacionará para el cartografiado de localización de los filamentos. Unas mediciones repetidas de cada ADN mejorarán la precisión del cartografiado de RecA.

55 La carga y masa añadida, y la estabilidad en alto contenido salido, cuando RecA está unida al ADN, hace que sea un candidato ideal para intentar la detección y el cartografiado de localización durante el transporte controlado con el instrumento propuesto.

También puede intentarse el control del ADN unido a RecA sin una esfera unida para detener la translocación. Al

igual que en los experimentos de ADNbc del ejemplo 1, puede utilizarse el control del voltaje activo para iniciar rápidamente el control del voltaje competidor antes de que el ADN salga de los nanoporos. Puesto que las especies cargadas que se unen al ADN afectan a la movilidad del ADN en un campo eléctrico, si se altera la carga neta y la rigidez del ADN, unos experimentos de afinación del control del movimiento podrían estudiar la influencia de la unión de RecA a ADNbc sobre el equilibrio de fuerzas utilizado para controlar el movimiento del ADNbc.

Este ejemplo puede demostrar que pueden medirse las longitudes más cortas de filamentos observados, a bajas concentraciones de RecA, a una SNR alta y a unas velocidades controladas y suficientemente lentas, de modo que cualquier proteína RecA unida en aislamiento puede detectarse si estuviese presente.

Por tanto, el dispositivo de dos poros proporciona un instrumento de una única molécula completamente nuevo para la investigación básica, puesto que se puede estudiar la capacidad de detectar la unión de proteínas adicionales al filamento de RecA-ADN, lo cual puede aumentar la anchura del filamento y así puede detectarse mediante una disminución en la corriente observada. Por ejemplo, las proteínas que se unen al filamento de RecA-ADN incluyen represores del bacteriófago lambda y LexA, que emplean RecA para detectar el estado de la célula y activar o desactivar acontecimientos reguladores corriente abajo.

Los experimentos de calibración implicarían detectar proteínas que se unen a secuencias específicas (localizaciones) sobre el ADN, de modo que los desplazamientos en la corriente inducidos por proteínas podrían permitir el cálculo de la velocidad y la actuación del control de la velocidad del ADN a través de los poros. Los ejemplos de proteínas que se unen a sitios específicos sobre ADNbc incluyen el represor Lac (que se une a un segmento de 21 pb), el represor del fago lambda (que tiene múltiples sitios de operador sobre ADN- λ), y otras proteínas.

Ejemplo 3: Detección y localización de un segmento bicatenario dentro de un ADN monocatenario

Este ejemplo demuestra la producción de hasta 10 kb de ADNmc con segmentos bicatenarios de longitud variable.

En una primera etapa, pueden crearse 10 kpb de ADNbc mediante PCR de largo alcance. Un extremo de la hebra se biotinila para la unión a esferas, y las hebras se separan mediante desnaturalización química. Se emplean 10 kb de ADNmc no unido a esferas como la hebra medida en los experimentos con dos poros. Pueden crearse segmentos monocatenarios complementarios con los tamaños deseados mediante PCR, seguido de la captura por las esferas y la separación de las hebras.

Pueden utilizarse segmentos de ADNmc de diferentes longitudes y en múltiples sitios dentro de los 10 kb de ADNmc medidos, comenzando con un conjunto de segmentos de 100 nt. Se emplea la corriente iónica a través de un único poro en estado sólido para diferenciar el ADNbc de los homopolímeros de ADNmc y los homopolímeros de purina y pirimidina como en Skinner *et al.*, Nano Lett., 9(8):2953-2960, enero de 2009). Así, la probabilidad de diferenciar segmentos monocatenarios de los segmentos bicatenarios en el ADN es alta a un voltaje suficientemente alto empleando el dispositivo de dos poros. El cartografiado de los segmentos de ADNmc frente a ADNbc permite la secuenciación con nanoporos empleando el método asistido por hibridación (aunque este método, según está propuesto, se basa en un proceso asistido por hibridación caro), y puede utilizarse para revelar la localización e identificar las secuencias de ADN diana a lo largo de distancias largas (secuenciación dirigida). También se puede estudiar el uso de proteínas de unión al ADN monocatenarias (SSB), como esferas que pueden amplificar aún más las diferencias entre ADNmc frente a ADNbc en la corriente iónica mediante su unión al ADNmc y la creación de una mayor impedancia que el ADNbc.

Ejemplo 4: Captura y control de ADNmc largo y localización de RecA

Este ejemplo demuestra la captura y el control de un ADNmc largo y la detección y localización de un filamento de RecA unido al ADNmc. Además, demuestra que el dispositivo de dos poros puede detectar los segmentos homopoliméricos de purina frente a pirimidina dentro del ADNmc.

El desenmarañamiento estocástico de 7 kb de ADNmc a través un poro de 10 nm en una membrana SiN de 20 nm puede realizarse como se muestra en Stefan *et al.*, Nano Lett., 10:1414-1420, 2010. Aunque el método de un único nanoporo en Stefan *et al.*, 2010, desenreda el ADNmc mediante una fuerza de contacto mecánica entre el ADNmc enmarañado y la superficie de la membrana/poro, se contempla que el sistema de voltaje competidor de poro dual pueda forzar electroforéticamente al ADNmc para que se desenmarañe cerca de los poros y entre ellos a unos voltajes competidores suficientemente altos, mediante la acción de cada fuerza de voltaje sobre el esqueleto del ADN más cercano a cada poro.

El desenmarañamiento y el posterior control de precisión de la velocidad del ADNmc a través del sistema de dos poros es importante para la secuenciación final de moléculas de ADNmc largas. A un voltaje suficientemente alto (aproximadamente 400 mV), es posible discriminar entre los segmentos homopoliméricos de purina y pirimidina dentro de un ADNmc (Skinner *et al.*, Nano Lett., 9(8):2953-2960, enero de 2009), lo cual resulta valioso para aplicaciones de diagnóstico y quizá para la investigación del cáncer.

Este ejemplo también estudia el uso de RecA, o quizá otras proteínas de unión a ADN monocatenario (SSB), como

"bombas de velocidad" detectables que puede diferenciarse de la corriente iónica del ADNmc mediante la unión al ADNmc y la creación de una impedancia mayor. Estas bombas de velocidad permiten la cuantificación directa de las velocidades del ADNmc controladas que sean posibles, lo cual, a su vez, demuestra que puede lograrse la velocidad de 1 ms/nt requerida. Puesto que no es necesario que RecA se una a sitios de secuencia trinucleotídica específicos, sino que se una preferentemente a las secuencias de TGG repetidas, y como también tiende a unirse cuando ya se han formado filamentos de RecA, los experimentos de calibración requerirán el uso de otras moléculas de unión al ADNmc que sí se unan a localizaciones de secuencia conocida específicas. Es necesario contar con sitios de unión conocidos que sean detectables a medida que pasan a través de cada poro para poder determinar la velocidad de la molécula como una función de los valores de los voltajes competidores. Un ejemplo no limitante consiste en emplear hebras dúplex (o hebras dúplex unidas a esferas) que se hibridan con uno o más sitios conocidos, en donde pueden utilizarse los desplazamientos en la corriente para detectar el paso de cada dúplex a través de cada poro, y después calcular la velocidad de paso de la hebra para los valores de voltaje escogidos. Después, los filamentos de RecA pueden formarse y detectarse sobre dichas moléculas, manteniendo la característica o características del dúplex como puntos de detección de referencia, con relación a los cuales pueden detectarse los filamentos de RecA e inferirse su posición.

Los métodos para determinar los haplotipos y el cartografiado de ADN mediante la incorporación de marcadores fluorescentes en el ADNbc (Xiao, *et al.*, patente de EEUU n.º 7771944 B2, 2010) también pueden utilizar el dispositivo de dos poros, puesto que los marcadores de las esferas (por ejemplo, puntos cuánticos o cualquier marcador fluorescente) son más voluminosos y producirán desplazamientos en la corriente justo de la forma en que lo harían las proteínas de unión sobre el ADNbc. Además, el método de dos poros es más sencillo y mucho más barato que la utilización de métodos de formación de imágenes de alta resolución (es decir, microscopía de fluorescencia de reflexión interna total) para detectar y cartografiar las posiciones del marcador. También se advierte que cualquier fluctuación en la velocidad provocada por el movimiento browniano durante el transporte controlado es mucho menos perjudicial para detectar características más grandes (proteínas, segmentos de dúplex, uniones a esferas) que para detectar características más pequeñas.

Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con las anteriores realizaciones, la anterior descripción y los ejemplos pretenden ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a la cual pertenece la invención.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un dispositivo amplificador dual y de poro dual, para controlar simultáneamente el movimiento de un polímero cargado a través de un primer (111) y un segundo poro (112), que comprende una cámara superior (cámara A), una cámara intermedia (cámara B) y una cámara inferior (cámara C),
 5 en el que la cámara superior está en comunicación con la cámara intermedia a través de un primer poro (111), y la cámara intermedia está en comunicación con la cámara inferior a través de un segundo poro (112),
 en el que el dispositivo comprende un suministro de energía configurado para proporcionar un primer voltaje entre la cámara superior y la cámara intermedia, y proporcionar un segundo voltaje entre la cámara intermedia y la cámara inferior, pudiendo ajustarse cada voltaje independientemente,
 10 en el que el dispositivo comprende componentes electrónicos de amplificador dual (131, 132) configurados para el control del voltaje y la medición de la corriente independientes en cada poro (111, 112), en el que los dos voltajes son diferentes en magnitud,
 en el que el primer y el segundo poro se configuran de modo que el polímero cargado es capaz de moverse simultáneamente a través de ambos poros (111, 112) en cualquier dirección y de una manera controlada, y
 15 en el que cada una de las cámaras comprende un electrodo (121, 122, 123) conectado al suministro de energía, que se caracteriza por que el primer poro (111) y el segundo poro (112) tienen un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, y están separados entre sí por una distancia de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1000 nm.
- 2.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el primer y el segundo poro (111, 112) son sustancialmente coaxiales.
- 3.- El dispositivo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el dispositivo comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, grafeno, nanotubos de carbono, TiO₂; HfO₂, Al₂O₃, capas metálicas, vidrio, nanoporos biológicos, membranas con poros biológicos insertados y sus combinaciones.
 25
- 4.- El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho primer y dicho segundo voltaje se configura para que pueda ser pinzado independientemente por dichos componentes electrónicos de amplificador dual (131, 132).
- 5.- El dispositivo de la reivindicación 4, en el que la cámara intermedia está conectada a una tierra común con relación a los dos voltajes.
 30
- 6.- El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cámara intermedia comprende un medio para proporcionar conductancia entre cada uno de los poros (111, 112) y el electrodo (122) en la cámara intermedia.
- 7.- El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polímero cargado se extiende a través de ambos primer y segundo poro (111, 112) al mismo tiempo.
 35
- 8.- El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el movimiento y la velocidad de movimiento del polímero cargado puede controlarse mediante la magnitud relativa y la dirección de los voltajes.
- 9.- El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer voltaje y el segundo voltaje son de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 10.000 veces tan altos, en magnitud, como la diferencia entre los dos voltajes.
 40
- 10.- El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que está presente un diferencial de voltaje neto entre el primer y el segundo voltaje a través de las cámaras superior e inferior.
- 11.- El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer poro (111) y el segundo poro (112) tienen una profundidad de aproximadamente 0,3 nm a aproximadamente 100 nm.
- 12.- Un método para controlar el movimiento de un polímero cargado a través de un poro, que comprende proporcionar el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y realizar las siguientes etapas:
 45 (a) cargar una muestra que comprende un polímero cargado en una de la cámara superior, la cámara intermedia o la cámara inferior del dispositivo, en el que el dispositivo está conectado a un sistema de pinzamiento de voltaje o un sistema de pinzamiento zonal de membrana para proporcionar un primer voltaje entre la cámara superior y la cámara intermedia, y un segundo voltaje entre la cámara intermedia y la cámara inferior;
 50 (b) ajustar un primer voltaje inicial y un segundo voltaje inicial, de modo que el polímero se mueva entre las cámaras,

situando con ello al polímero a través del primer y del segundo poro (111, 112); y

- 5 (c) ajustar el primer voltaje y el segundo voltaje de modo que ambos voltajes generen una fuerza para arrastrar al polímero cargado de la cámara intermedia, en el que los dos voltajes son diferentes en magnitud, bajo condiciones controladas, de modo que el polímero cargado se mueva a través de ambos poros en una dirección y de una manera controlada.
13. El método de la reivindicación 12, en el que la muestra se carga en la cámara superior y el primer voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero cargado desde la cámara superior hacia la cámara intermedia, y el segundo voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero desde la cámara intermedia hacia la cámara inferior.
- 10 14. El método de la reivindicación 12, en el que la muestra se carga en la cámara intermedia y el primer voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero cargado desde la cámara intermedia hacia la cámara superior, y el segundo voltaje inicial se ajusta para arrastrar al polímero cargado desde la cámara intermedia hacia la cámara inferior.
- 15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el primer voltaje y el segundo voltaje ajustados en la etapa (c) son de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 10.000 veces tan grandes, en magnitud, como la diferencia entre los dos voltajes.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende además identificar una unidad monomérica del polímero, mediante la medición de una corriente iónica a través de uno de los poros (111, 112) cuando la unidad monomérica pasa a través de ese poro (111, 112).
17. El método de la reivindicación 16, en el que la unidad monomérica es un nucleótido o una pareja de nucleótidos.
- 20 18. El método de la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en el que el monómero está unido a una molécula.
19. El método de la reivindicación 18, en el que la molécula es una proteína de unión al ADN o una nanopartícula.
- 25 20. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19 para determinar la secuencia de un polinucleótido, en el que la muestra se carga en la cámara superior del dispositivo, y la muestra comprende un polinucleótido, y en el que el método comprende además identificar cada nucleótido del polinucleótido que pasa a través de uno de los poros (111, 112), mediante la medición de una corriente iónica a través del poro (111, 112) cuando el nucleótido pasa a través de ese poro (111, 112).

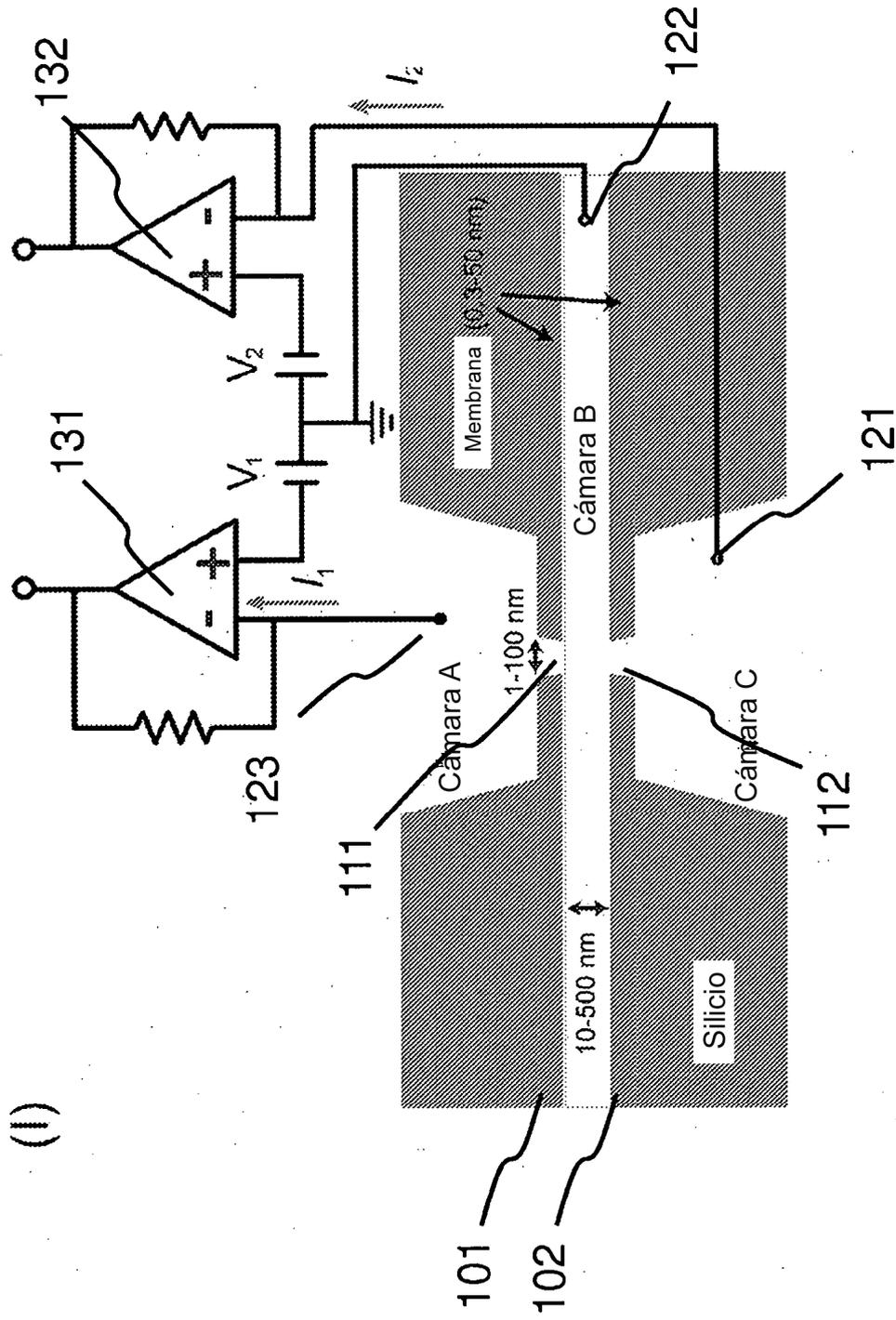


FIG. 1

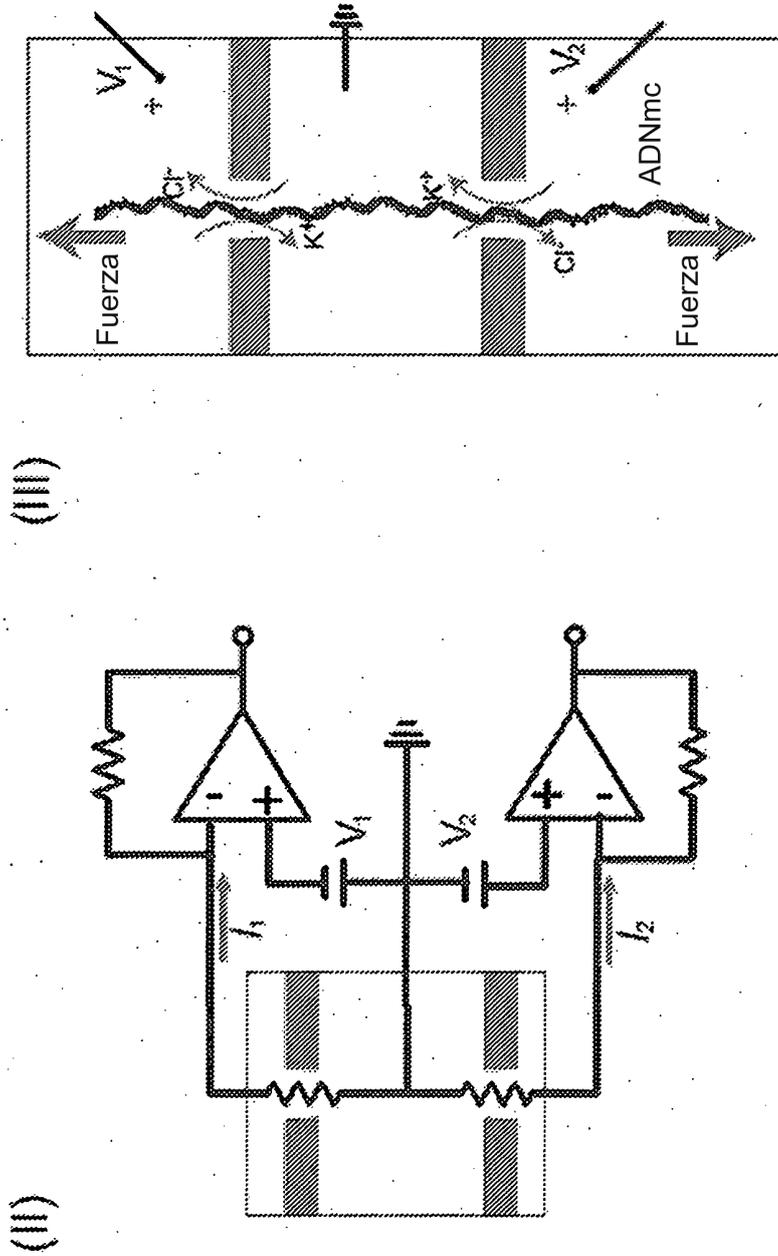


FIG. 1 (cont.)

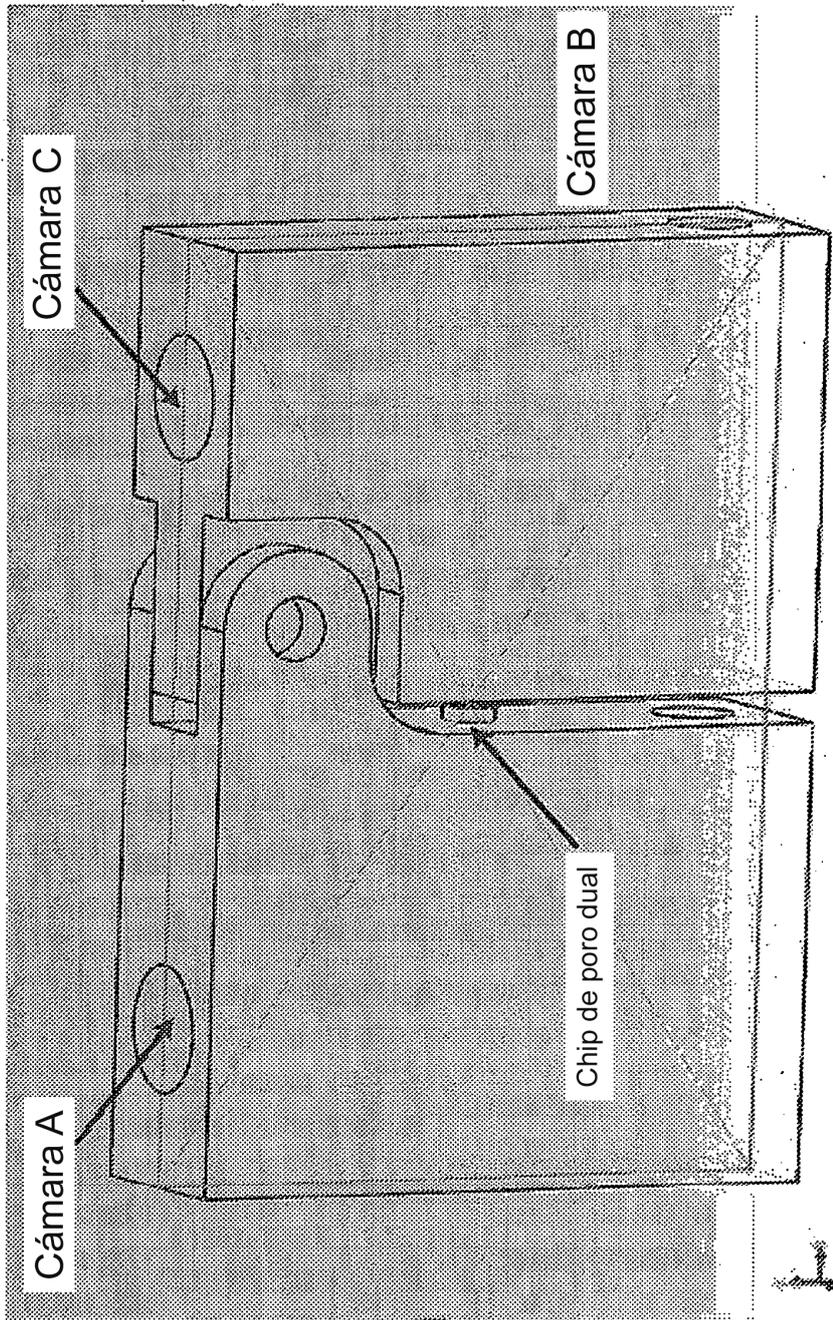


FIG. 2