

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 089**

51 Int. Cl.:

G01N 21/55 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2008 PCT/GB2008/050783**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2009 WO09030953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008 E 08788753 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2188618**

54 Título: **Aparato y método para investigar moléculas por resonancia del plasmón superficial**

30 Prioridad:

04.09.2007 GB 0717150

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

15.06.2017

73 Titular/es:

**BASE4 INNOVATION LIMITED (100.0%)
Broers Building, JJ Thomson Avenue
Cambridge CB3 0FA, GB**

72 Inventor/es:

FRAYLING, CAMERON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 617 089 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aparato y método para investigar moléculas por resonancia del plasmón superficial

- 5 La presente invención se refiere a un aparato y a métodos para investigar moléculas, en particular moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos o proteínas. El aparato y los métodos están relacionados con la aplicación de tecnología a escala nanométrica a los problemas del análisis rápido y detallado de estas moléculas. En un aspecto, la presente invención se refiere a un aparato y a un método de secuenciación de ácidos nucleicos.
- 10 La capacidad de secuenciar rápidamente ácidos nucleicos sigue siendo de vital importancia en biología. Aunque ahora se conoce secuencia completa de muchos genomas (incluyendo la del genoma humano) y muchas más se están volviendo disponibles, sigue existiendo una necesidad de obtener datos de secuencia por muchas razones. Las actuales tecnologías de secuenciación se basan principalmente en la técnica ("didesoxi") de Sanger y son laboriosas y lentas. Los métodos que implican la detección de la incorporación de nucleótidos individuales por una polimerasa están limitados intrínsecamente a la velocidad relativamente lenta a la que una polimerasa puede sintetizar una cadena de ADN complementaria. Actualmente, la máxima velocidad de secuenciación para un único dispositivo de secuenciación es de aproximadamente 1 base/segundo; aunque una mejora respecto a las técnicas de secuenciación de Sanger convencionales, esto sigue siendo muy lento.
- 15
- 20 Se han propuesto métodos mediante los cuales el ADN es secuenciado detectando cambios de corriente a medida que el ADN pasa a través de un poro conductor. Aunque dichos métodos tienen una velocidad de detección máxima teórica elevada, hasta la fecha se han conseguido velocidades de detección relativamente lentas y parece probable que sin modificación exhaustiva del diseño global o el uso de etiquetas conductoras, el límite de detección seguirá siendo bajo.
- 25
- La nanotecnología, como la biología, es un área que se está desarrollando rápidamente y conduce a nuevos enfoques y materiales para la manipulación y el análisis de moléculas. Los nanotecnólogos son capaces ahora de producir y manipular materiales hasta la escala subnanométrica. Esto proporciona el potencial para el desarrollo de dispositivos o técnicas con un potencial nuevo y previamente no considerado. Sin embargo, aunque la nanotecnología ha resultado útil, por ejemplo, en la industria electrónica, aún no ha sido empleada ampliamente en el campo de la biología.
- 30
- La resonancia del plasmón es un fenómeno mediante el cual plasmones sobre una superficie metálica son excitados por luz incidente sobre la superficie. La resonancia del plasmón se usa en una serie de máquinas analíticas convencionales, tales como Biacore®. Donde plasmones sobre una superficie plana son excitados, se usa la expresión resonancia del plasmón superficial (RPS), y donde una partícula de tamaño nanométrico es excitada, a menudo se usa la expresión resonancia del plasmón superficial localizada (RPSL) para diferenciar este aspecto del fenómeno. Cuando una partícula metálica pequeña es irradiada mediante luz, el campo eléctrico oscilante hace que los electrones de la partícula oscilen de forma coherente. La oscilación colectiva de estos electrones es llamada la resonancia del plasmón dipolar. La oscilación colectiva en la nube electrónica produce un campo electromagnético (CEM) altamente localizado e intenso. Con el fin de producir estas oscilaciones colectivas, debe usarse la longitud de onda de excitación correcta. Esta longitud de onda dependerá tanto del tamaño como de la forma de la partícula o la nanoestructura metálica que es excitada.
- 35
- 40
- 45 El documento DE10361927 desvela un sensor biosensor de canal iónico que comprende un sustrato perforado intercalado entre dos depósitos definidos por agrupaciones de microcanales. Cada una de dichas agrupaciones está orientada de forma ortogonal unas con respecto a otras. Las perforaciones en el sustrato son normalmente de 5 a 50 micrómetros de diámetro. También contienen una fracción de canal iónico (membrana de proteína) que bloquea o permite el flujo de iones entre los dos depósitos dependiendo de la presencia o ausencia de un nivel umbral de un producto químico que es detectado en el lado de entrada. La solución contenida dentro del depósito de entrada es de mayor fuerza iónica que aquella en el depósito de salida, proporcionando de este modo la fuerza impulsora termodinámica necesaria para el transporte de iones. En una realización preferida, la solución del depósito de entrada contiene iones de calcio que fluyen cuando el canal iónico está abierto. Estos iones de calcio pueden ser capturados por un marcador en el depósito de salida y pueden transportarse a un detector independiente.
- 50
- 55 Se ha descubierto que, usando RPS altamente localizada, conseguible usando técnicas nanotecnológicas, la estructura de moléculas biológicas puede investigarse a escala nanométrica.
- De acuerdo con la presente invención, se proporciona un aparato para investigar una molécula (20) que comprende:
- 60
- dos depósitos separados entre sí por un sustrato (11), el primer depósito (19) adecuado para recibir una muestra que comprende la molécula (20) a investigar, y un segundo depósito (21) adecuado para que la molécula (20) pase al interior una vez que ha pasado a través de al menos un canal (10) provisto en el sustrato (11), siendo el canal (10) adecuado para el paso de la molécula (20) a su través;
- 65
- al menos una nanopartícula metálica (14) capaz de generar un campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón;

- medios para inducir el paso de una molécula (20) a través del canal (10);
 - medios para inducir resonancia del plasmón en la nanopartícula metálica (14); y
 - medios para detectar interacción entre el campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón producido por la nanopartícula metálica (14) y una molécula (20) que pasa a través del canal (10), caracterizados por que:
- 5 - el al menos un canal es un nanoporo (10) que tiene un diámetro de 0,5 nm a 100 nm; y
- la al menos una nanopartícula metálica (14) está ubicada sobre el sustrato (11) adyacente a dicho nanoporo (10) y dispuesta en una posición adecuada para que el campo electromagnético producido por la nanopartícula metálica (14) interactúe con una molécula (20) que pasa a través del nanoporo (10).
- 10 El aparato comprende dos depósitos: un primer depósito adecuado para recibir una muestra que comprende la molécula a investigar, y un segundo depósito adecuado para que la molécula pase al interior una vez que ha pasado a través del nanoporo.
- 15 Los dos depósitos están separados entre sí por el sustrato, y la molécula debe pasar a través del al menos un nanoporo para pasar desde el primer depósito al interior del segundo depósito. De este modo, podría considerarse que el sustrato es una membrana o diafragma que separa los dos depósitos.
- 20 Generalmente las dimensiones del nanoporo deben ser adecuadas para que una molécula a investigar pase a través del nanoporo, y de modo que la molécula esté obligada a pasar adecuadamente cerca de la nanopartícula metálica de modo que se produzca una interacción entre la molécula y el CEM localizado producido por la nanopartícula metálica. El nanoporo generalmente debe tener también dimensiones adecuadas, de modo que solamente una molécula pueda pasar a través del nanoporo cada vez.
- 25 Generalmente se prefiere que el nanoporo sea un orificio, aunque es posible que otras formas de canales tales como ranuras o surcos provistos en un sustrato también puedan ser adecuadas.
- El nanoporo puede tener cualquier forma adecuada, aunque un nanoporo circular o aproximadamente circular está previsto como el más conveniente.
- 30 El nanoporo tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 nm a 100 nm preferentemente 50 nm o menos, especialmente 30 nm o menos. Aunque se usa el término diámetro, debe entenderse que esto no significa en un sentido geométrico estricto y puede aplicarse, por ejemplo, a la dimensión más pequeña de un nanoporo no circular.
- 35 A menudo, orificios pequeños en un sustrato se denominan "poros", y este término puede usarse en toda la memoria descriptiva y debe interpretarse en consecuencia.
- 40 Donde la molécula a investigar es un ácido nucleico, el orificio más pequeño a través de cual pasará ácido nucleico monocatenario es de aproximadamente 1 nm. Los ácidos nucleicos bicatenarios pasarán a través de un orificio de aproximadamente 2 nm o mayor [véase Heng J. B. et al. *Biophysical Journal* (2006), 90, 1098-1106].
- 45 Por consiguiente, donde un ácido nucleico monocatenario es a investigar, es preferible que el nanoporo deba ser de 1 nm a 100 nm de diámetro, preferentemente 1 nm a 30 nm, especialmente 1 a 10 nm, particularmente 1 a 5 nm. Para ácidos nucleicos bicatenarios, el nanoporo debe ser de 2 nm a 100 nm de diámetro, preferentemente de 2 nm a 30 nm, especialmente de 2 nm a 4 nm.
- El nanoporo puede estar formado de cualquier sustancia adecuada. Puede ser orgánico o inorgánico.
- 50 En una realización, el nanoporo puede estar formado a partir de un poro "orgánico", es decir un poro derivado de una estructura de origen natural, por ejemplo una proteína que tiene un poro tal como α -hemolisina o el poro orgánico descubierto en la membrana externa de la mitocondria.
- Como alternativa, el nanoporo podría proporcionarse mediante un gel usado convencionalmente para la manipulación de ácido nucleico u otras moléculas biológicas, tales como agarosa o poliacrilamida.
- 55 Como alternativa, el nanoporo podría estar diseñado en un sustrato tal como una película formada a partir de nitrato de silicio u otro material de ese tipo. Véase, por ejemplo, Ho C. et al., *PNAS* (2005), 102(30) 10445-10450 que describe métodos de formación de poros de diámetro nanométrico a partir de nitrato de silicio.
- 60 El nanoporo también podría estar formado a partir de un material nanoporoso tal como oro poroso, un cristal coloidal, cavidades coloidales, toroides metálicos etc. *Netti et al.*, describen la formación de nanocavidades de oro y su capacidad para formar plasmones superficiales [véase *Netti M.C. et al. Advanced Materials* (2001), 13(18), 1368-1370]. *Aizpurua O. et al.*, describen la formación de nanoanillos de oro [véase *Aizpurua et al. Physical Review Letters* (2003), 90(5), 057401-1-057401-4].
- 65 *Lesuffleur et al.*, describen agrupaciones de nanoporos de oro con resonancia del plasmón mejorada [*Lesuffleur A. et al, Applied Physics Letter* (2007), 90, 243110]. Donde el propio nanoporo está formado a partir de una sustancia

metálica capaz de mostrar RPSL, entonces será evidente que puede no requerirse una nanopartícula metálica independiente.

5 Los medios para ingeniería nanométrica para producir diversas estructuras adecuadas para la presente invención son bien conocidos, pero éste es también un campo de tecnología que se desarrolla rápidamente. Por lo tanto, se espera que novedosas tecnologías y materiales adecuados para formar nanoporos en un sustrato según lo requiere la presente invención se desarrollarán en el futuro; dichas tecnologías están dentro del alcance de la presente invención.

10 Generalmente se prefiere que el aparato comprenda una pluralidad de nanoporos que pasan a través del sustrato. Los nanoporos podrían estar dispuestos en una agrupación donde la posición de cada nanoporo está controlada; esto es particularmente conveniente donde se usa ingeniería nanométrica para formar nanoporos en un sustrato. Como alternativa, los nanoporos podrían estar dispersos por el sustrato sin control sobre su posición.

15 La nanopartícula metálica debe ser capaz de formar plasmones superficiales y, de este modo, formar un CEM localizado en las inmediaciones de la nanopartícula. Cualquier material que es adecuado para conseguir esta función es adecuado para uso en la nanopartícula metálica. Se ha descubierto que los metales oro, plata, cobre y aluminio tienen propiedades deseables en términos de formación y propagación de plasmón y, por lo tanto, generalmente se prefiere que la nanopartícula metálica esté formada principal o completamente a partir de uno o
20 más de estos metales.

La nanotecnología permite la formación de partículas de oro o plata en esencialmente cualquier forma. La forma puede tener un efecto sustancial sobre el CEM producido por una partícula [véase Mock J. J. et al., Journal of Chemical Physics, 116(15), 6755-6759].

25 Una partícula esférica o sustancialmente esférica (por ejemplo, una esfera o esferoide) tiene propiedades adecuadas y, por lo tanto, forma una realización adecuada de la nanopartícula metálica. Se ha descubierto que las partículas metálicas esféricas que tienen un diámetro de 50 nm a 150 nm de diámetro son especialmente adecuadas debido a niveles elevados de intensificación de fluorescencia [véase Nakamura y Hayashi, Japanese Journal of Applied Physics, 44(9A), 6833-6837].

30 En una realización alternativa, puede usarse una nanopartícula metálica anular. Dicha nanopartícula anular presenta ciertos beneficios; se ha demostrado que el CEM dentro de un anillo es intenso y es relativamente constante por toda el área interna definida por el anillo [véase Aizpurua *et al.*, *ibidem*]. Donde la nanopartícula metálica es un anillo, será obvio que el anillo podría, a su vez, formar la nanopartícula a través de la cual pasará la molécula. Métodos de fabricación de dichos nanoanillos se exponen en Aizpurua *et al.*

Otras formas tales como prismas poligonales u otras formas de múltiples lados también pueden ser adecuadas.

40 En aras de la claridad, se señala que puede haber más de una nanopartícula metálica asociada con un nanoporo particular, y puede usarse más de un tipo de metal. De hecho, puede ser deseable usar dos o más materiales metálicos de modo que una región de máximo CEM se produzca como resultado de combinación de los CEM separables de cada nanopartícula. Esto puede dar origen a valores de CEM extremadamente altos en áreas altamente localizadas.

45 Es generalmente importante que la nanopartícula metálica esté dispuesta en una posición tal que interactuará con una molécula que pasa a través del nanoporo, pero esté separada suficientemente del nanoporo para impedir o mitigar la extinción de una señal emitida desde la molécula. Esto puede conseguirse de una serie de maneras. El nanoporo puede estar conformado y dimensionado de modo que una molécula que pasa a través de él esté constreñida en una posición tal que no se acerque demasiado (evitando de este modo la extinción), o se aleje demasiado (garantizando de este modo la interacción) de la nanopartícula metálica - esto es especialmente adecuado cuando el propio nanoporo no tiene actividad de extinción. Como alternativa, pueden usarse medios de control para guiar la molécula, de modo que no se acerque demasiado a la nanopartícula metálica.

50 Normalmente, la superficie de la nanopartícula metálica debe estar posicionada para estar a 50 nm o menos de la molécula a medida que pasa a través del nanoporo, preferentemente 30 nm o menos, especialmente 10 nm o menos.

60 Los medios para inducir el paso de una molécula a través del nanoporo pueden ser uno o más de medios para inducir electroforesis, un dispositivo microfluídico o un dispositivo de captura con láser. Sin embargo, también pueden ser adecuados cualesquiera otros medios adecuados para inducir que la molécula se mueva hasta y/o a través del nanoporo.

65 El aparato puede comprender medios de control para controlar el paso de la molécula hacia, al interior y/o a través del nanoporo. Los medios de control pueden estar adaptados para controlar uno o más de la velocidad, la dirección, la posición o la conformación de la molécula.

El tipo de medios de control variará dependiendo del tipo de molécula a investigar y el tipo de control requerido. Donde se requiere secuenciación de ácido nucleico, es importante que la velocidad de paso de la molécula de ácido nucleico lineal a través del nanoporo esté controlada. Para secuenciación, también es deseable que la molécula de ácido nucleico se mantenga en una conformación lineal.

5 En una realización, los medios de control pueden comprender una matriz porosa a través de la cual pasa la molécula, estando la matriz porosa inmediatamente adyacente a la entrada al nanoporo. Donde se usa una matriz porosa, es conveniente que se induzca el paso de la molécula a través de la matriz mediante electroforesis. Las propiedades de la matriz porosa en combinación con las condiciones de electroforesis sirven para permitir el control fino del movimiento de la molécula (por ejemplo, ácido nucleico) a través de la matriz y al interior del nanoporo. El control preciso de la velocidad de movimiento de un ácido nucleico a través de un gel puede conseguirse. Una ventaja adicional de la electroforesis a través de una matriz porosa es que la conformación de una molécula lineal es estirada a una forma lineal alargada a partir de la cual es particularmente adecuada para secuenciación. Una matriz porosa adecuada puede estar formada a partir de materiales convencionales usados para manipular ácido nucleicos y proteínas, tales como poliacrilamida o agarosa. Como alternativa, otros materiales nanoporosos también pueden ser adecuados.

Los medios de control descritos anteriormente son muy adecuados para el control de ácidos nucleicos y otras moléculas lineales. Otras moléculas pueden requerir un nivel de control diferente, o el grado de control puede ser mayor o menor.

Debe observarse que los medios para inducir el paso de una molécula a través del nanoporo y los medios de control pueden proporcionarse mediante los mismos medios. Por ejemplo electroforesis en un medio líquido en solitario puede ser adecuada para controlar moléculas donde no se requiere el control preciso de la conformación y la velocidad. Como alternativa, puede usarse captura con láser para controlar de forma precisa el movimiento de una molécula hacia y al interior del nanoporo.

Los medios para detectar interacción de la nanopartícula metálica y la molécula pueden ser, por supuesto, cualquier dispositivo adecuado que pueda detectar la interacción entre el CEM localizado derivado de resonancia del plasmón producido por la nanopartícula y la molécula muy próxima a ella. Los medios adecuados pueden incluir medios para detectar fluorescencia o medios para detectar dispersión Raman.

Los medios adecuados para detectar fluorescencia incluyen cualquier dispositivo que sea suficientemente sensible para detectar fotones emitidos desde un fluoróforo que pasa a través de la región del CEM. Los dispositivos adecuados incluyen un fotomultiplicador o un fotodiodo de avalancha. La fluorescencia es adecuada para detectar moléculas inherentemente fluorescentes o moléculas que han sido etiquetadas con un fluoróforo.

Los medios adecuados para detectar dispersión Raman incluyen un espectrómetro Raman.

40 Para detectar moléculas no etiquetadas y no fluorescentes puede usarse dispersión Raman. Técnicas para detectar dispersión Raman son bien conocidas en la materia. La detección usando dispersión Raman en la presente invención se basa en el fenómeno de espectroscopía Raman intensificada por superficie [véase para antecedentes Jeanmaire, David L.; Richard P. van Duyne (1977). "Surface Raman Electrochemistry Part I. Heterocyclic, Aromatic and Aliphatic Amines Adsorbed on the Anodized Silver Electrode". Journal of Electroanalytical Chemistry 84: 1-20.]

45 En muchas realizaciones puede preferirse que se use un método de detección que no dependa del etiquetado de la molécula. Esto simplifica la preparación de la muestra a investigar, y tampoco requiere la presencia de una etiqueta que pueda interferir en el paso de la molécula a través del canal.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para investigar una molécula (20) que comprende las etapas de:

- proporcionar una muestra de fluido que comprende una molécula (20) a investigar, en la que la molécula (20) es opcionalmente una molécula biológica (20) y opcionalmente un ácido nucleico;
- 55 - inducir el paso de dicha molécula (20) a través de un nanoporo (10) provisto en un sustrato (11), teniendo el nanoporo (10) un diámetro de 0,5 nm a 100 nm, en el que una nanopartícula metálica (14) está ubicada sobre el sustrato (11) adyacente a la abertura de un nanoporo (10) y se le induce la generación de un campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón; y
- detectar interacción entre el campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón producido por la nanopartícula metálica (14) y la molécula (20) a medida que pasa a través del nanoporo (10).

60 Preferentemente, la molécula es una molécula biológica, por ejemplo un ácido nucleico o una proteína/péptido. Moléculas lineales tales como ácidos nucleicos o proteínas/péptidos lineales son particularmente adecuadas para investigación usando el presente método. Los ácidos nucleicos monocatenarios son especialmente adecuados para investigación usando el presente método.

65

En una realización preferida, el método es un método de secuenciación de un ácido nucleico.

Sin embargo, el método también puede usarse para investigación de otras clases de moléculas, y no es necesario usarlo para secuenciación. El uso del método para contar moléculas individuales en una muestra, y el mapeo de etiquetadores en moléculas lineales están previstos entre otros usos potenciales.

Puede preferirse, aunque no es esencial, que la molécula comprenda una etiqueta que interactúa con la nanopartícula metálica. Por consiguiente, el método puede comprender, además, la etapa de etiquetar la molécula con una etiqueta que interactuará con dicha nanopartícula metálica.

Las etiquetas adecuadas incluyen fluoróforos. Los fluoróforos son muy conocidos en la técnica en relación con el etiquetado fluorescente de todo tipo de moléculas biológicas. En la presente invención, es importante que el fluoróforo sea suficientemente pequeño para que no inhiba el paso de la molécula etiquetada a través del canal. Normalmente, el fluoróforo tendrá un tamaño efectivo de 2 nm o menos, y preferentemente una molécula colorante que mida menos de 1 nm en cualquier dimensión.

Los ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen Rosa de Bengala, Alexa Fluor 488 C₅-maleimida, Alexa Fluor 532 C₂-maleimida y Rojo Rodamina C₂-maleimida, y Verde Rodamina. Estos fluoróforos pueden usarse, cada uno, para etiquetar las bases de ácidos nucleicos usando técnicas conocidas en la técnica.

Adecuadamente, la molécula es un ácido nucleico en el que una proporción sustancial o toda de una base particular ha sido etiquetada. En una realización preferida, una proporción sustancial o toda de una o más bases en la molécula están etiquetadas, teniendo cada tipo de base una etiqueta con un espectro de emisión identificable individualmente. En una realización especialmente preferida todas, o sustancialmente todas, las bases están etiquetadas, teniendo cada tipo de base una etiqueta con un espectro de emisión identificable individualmente. El etiquetado de alta densidad de ácido nucleico se describe en Tasara et al., Nucleic Acids Research, 2003, 31(10), 2636-2646.

Es importante que un fluoróforo seleccionado como una etiqueta sea capaz de interactuar con el CEM producido por la nanopartícula metálica. Es un asunto rutinario hacer coincidir un fluoróforo con una nanopartícula metálica de propiedades particulares. En general, para buena interacción entre la nanopartícula metálica y el fluoróforo, se prefiere que el fluoróforo tenga un pico de emisión a una energía ligeramente inferior que el pico de resonancia del plasmón superficial localizada de la nanopartícula metálica, es decir el pico de emisión del fluoróforo está ligeramente desplazado hacia el rojo desde el pico de RPSL. Son adecuados desplazamientos hacia el rojo de aproximadamente 20 a 150 meV, preferentemente de aproximadamente 40 a 120 meV [véase Chen et al., Nano Letters (2007), 7(3), 690-696].

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un sustrato (11) adecuado para uso en un aparato para investigar una molécula (20) que comprende:

- al menos un canal (10) provisto en el sustrato (11), el canal (10) adecuado para el paso de una molécula (20) a su través; y
- al menos una nanopartícula metálica (14) capaz de generar un campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón,

caracterizado por que:

- el al menos un canal es un nanoporo (10) que tiene un diámetro de 0,5 nm a 100 nm; y
- la al menos una nanopartícula metálica (14) está ubicada sobre el sustrato (11) adyacente a dicho nanoporo (10) para estar a 50 nm o menos de la molécula (20) a medida que pasa a través del nanoporo (10) y dispuesta en una posición tal que el campo electromagnético producido por la nanopartícula metálica (14) es capaz de interactuar con una molécula (20) que pasa a su través.

Detalles adicionales de sustratos preferidos se han expuesto anteriormente.

A continuación se describirán realizaciones de la invención, a modo de ejemplos no limitantes, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 muestra un poro y electrodo adecuados para uso en la presente invención;

La figura 2 muestra un sustrato que comprende poros y electrodos;

La figura 3 muestra una representación esquemática de aspectos de un aparato de acuerdo con la presente invención;

La figura 4 muestra una representación esquemática de una realización de un aparato de acuerdo con la presente invención; y

Las figuras 5 a 7 muestran representaciones esquemáticas de estructuras alternativas del sustrato.

Antecedentes

5 Cuando una partícula metálica esférica pequeña es irradiada con luz, el campo eléctrico oscilante hace que los electrones de la partícula oscilen de forma coherente. La oscilación colectiva de estos electrones es llamada la resonancia del plasmón dipolar. La oscilación colectiva en la nube electrónica produce un campo electromagnético altamente localizado e intenso (CEM). Con el fin de producir estas oscilaciones colectivas, debe usarse la correcta longitud de onda de excitación. Esta longitud de onda dependerá tanto del tamaño como de la forma de la partícula metálica que es excitada. La longitud de onda correcta para una partícula particular puede determinarse fácilmente experimentalmente o, para ciertas formas, puede predecirse usando técnicas de modelización conocidas.

10 Se ha demostrado en [1] que el CEM producido por la resonancia del plasmón de coloides metálicos tales como nanopartículas de oro o plata puede usarse para excitar etiquetas fluorescentes usadas comúnmente tales como Cy5 y Rosa de Bengala, entre otras. Estos experimentos implicaban colocar nanopartículas de oro o plata sobre una superficie y situar los fluoróforos de modo que se beneficien del CEM intensificado. Esto da como resultado lo que se denomina fluorescencia intensificada por un metal (FIM).

15 Cuando un fluoróforo se coloca cerca de una partícula metálica que muestra resonancia del plasmón, el fluoróforo se beneficia tanto del CEM localizado como de un fenómeno peor entendido en el que el tiempo de vida fluorescente se reduce. Un fenómeno similar se produce cuando se examina la dispersión Raman de una molécula. Donde la molécula está en estrecha proximidad a una partícula metálica que muestra resonancia del plasmón superficial localizada, se observa un incremento drástico del nivel de dispersión Raman.

20 Dado que la emisión de fotones máxima de un fluoróforo se determina mediante su rendimiento cuántico y tiempo de vida fluorescente, un tiempo de vida fluorescente más corto da como resultado una emisión de fotones más elevada. Un fluoróforo que tiene un 90 % de rendimiento cuántico y un tiempo de vida fluorescente de 2,5 ns podría emitir un máximo de 360 millones de fotones/s. En realidad, los colorantes fluorescentes pueden emitir varios millones de fotones antes del deterioro.

25 Induciendo un CEM intensificado altamente localizado, tal como se ha demostrado usando agrupaciones coloidales de oro y plata, [1, 2] así como en nanocristales coloidales [3], nanocavidades cristalinas fotónicas [4], nanoanillos metálicos [5] y películas metálicas finas porosas [6] y posicionar un fluoróforo de modo que se beneficiará de esto, puede inducirse FIM y el fluoróforo detectarse, o como alternativa detectarse dispersión Raman.

30 Si un dispositivo está fabricado de modo que exista una región en el espacio donde solamente un fluoróforo pueda beneficiarse de FIM en un momento dado, la posición de ese fluoróforo puede ser conocida. Mediante la disposición de una estructura plasmónica (por ejemplo una fracción metálica) alrededor de o adyacente a un orificio (poro), una partícula fluorescente puede orientarse de modo que pase a través de un área de máxima intensificación fluorescente (MaxIF). Los poros adecuados incluyen: geles (usados comúnmente para confinar polinucleótidos), poros orgánicos tales como α -hemolisina, poros en estado sólido tales como los que pueden realizarse en nitruro de silicio, materiales nanoporosos tales como oro poroso, cristales coloidales, cavidades coloidales, toroides metálicos, o cualquier otro poro de menos de 10 nm de diámetro y preferentemente menos de 5 nm de diámetro, especialmente entre 1,5 y 2,5 nm.

35 Dado lo siguiente:

- 40
- el CEM entre dos superficies con resonancia del plasmón se incrementa cuando la distancia entre ellas se reduce,
 - que la proximidad a una superficie con resonancia del plasmón también reduce el tiempo de vida fluorescente del fluoróforo,
 - 45 - que las distancias entre estas superficies pueden hacerse de menos de 5 nm,
 - y que los coloides, películas finas porosas, agrupaciones de cristal en 2D, y otras nanoestructuras pueden hacerse de menos de 2 nm de tamaño,

50 es razonable asumir que puede hacerse que la emisión de fotones máxima se produzca en una región extremadamente pequeña.

55 De una manera similar, propiedades particulares de una molécula, o regiones dentro de una molécula, pueden identificarse mediante patrones característicos de dispersión Raman. Esto, como con la identificación de la ubicación de un fluoróforo particular, la posición de una característica particular que tiene un espectro Raman identificable puede identificarse por su proximidad a la estructura plasmónica.

60 Si se induce el paso de un ion a través de un poro por medio de, por ejemplo microfluídica o electroforesis, se le puede hacer pasar a través de esta área de MaxIF, de modo que la detección de un único conjugado ion-fluoróforo, o una región que tiene un espectro Raman particular pueda detectarse.

65

Induciendo el paso de un ion cargado etiquetado de forma fluorescente, tal como una proteína, a través de un nanoporo de modo que solamente un ion pueda desplazarse a través del poro cada vez, la cuantificación de esos iones sería posible de la siguiente manera:

- 5 - Dados dos conjugados partícula/ion fluorescentes idénticos, a medida que el primero pasa a través del poro y entra en el CEM confinado, el fluoróforo comenzará a emitir fotones. A medida que el fluoróforo se acerca más a la región de MaxIF, un número creciente de fluoróforos son emitidos. Dado que la emisión de fotones está directamente relacionada con la intensidad del CEM, que a su vez se incrementa exponencialmente a medida que la distancia hasta la región de MaxIF se reduce, la emisión de fotones también se incrementará exponencialmente, produciendo un pico de emisión de fotones en la región de MaxIF y disminuyendo a medida que el conjugado se aleja del área de MaxIF. La segunda partícula fluorescente idéntica producirá el mismo patrón de emisión de fotones. Mientras que la emisión de fotones máxima se produzca en una región discreta con un grosor menor que la distancia entre los dos conjugados fluoróforo/ion, la fluorescencia producida por estos dos fluoróforos puede diferenciarse.
- 15 - Si los dos conjugados están separados tan estrechamente entre sí (menos de 0,5 nm) que la detección individual sería difícil, la presencia de más de un fluoróforo en el área de MaxIF podría determinarse mediante emisión de fotones. Dos fluoróforos idénticos expuestos a intensidades de CEM iguales deben emitir aproximadamente dos veces tantos fotón/es que un único fluoróforo. Dado que una región de MaxIF puede contener dos, tres o más conjugados, si la velocidad a la que se desplazan a través del CEM es conocida, la cuantificación del número de conjugados que pasan a través del CEM puede conseguirse.

Creando dos cámaras separadas por una barrera que garantiza que los iones solamente podrían pasar de un lado al otro mediante un poro, los iones cuya migración puede ser inducida podrían cuantificarse independientemente de si la región de MaxIF puede contener dos, tres o más conjugados siempre que ese número haya sido determinado.

Etiquetado de ácidos nucleicos

Etiquetas fluorescentes se incorporan comúnmente en los ADN y ARN con polinucleótidos tanto monocatenarios (mc) como bicatenarios (bc). Existen muchos métodos bien establecidos para incorporar etiquetas fluorescentes en ADN y mediante la elección cuidadosa tanto de ADN polimerasa como de nucleótido modificado de forma fluorescente. Se ha mostrado [7] que es posible etiquetar de forma fluorescente todas de una o más de las cuatro bases (CGTA). Se sabe que las distancias entre nucleótidos en ADNbc y ARNbc son de 0,34 nm, mientras que el ADNmc y ARNmc, los polímeros pueden estar en conformación lineal, permitiendo que la máxima separación espacial sea mayor-aunque la distancia exacta varía entre 0,5 y 1 nm dependiendo de la fuerza de estiramiento impuesta [8].

El proceso de secuenciación

Es conocido que el control preciso de la velocidad a la cual una cadena individual de ADN pasa a través de un poro orgánico tal como α -hemolisina [10] o un poro en estado sólido en nitruro de silicio puede conseguirse [8, 9]. Etiquetando un polinucleótido, de modo que todas de una o más de sus bases están etiquetadas de forma fluorescente e induciendo el paso de ese polinucleótido mediante microfluídica, electroforesis o algunos otros medios a través de un CEM a una velocidad conocida, de modo que los nucleótidos pasen a través de una región de MaxIF capaz de contener al menos un nucleótido etiquetado de forma fluorescente, la posición de los nucleótidos etiquetados a lo largo del fragmento de ADN puede determinarse.

Una secuencia de polinucleótidos completa podría ensamblarse de la siguiente manera:

Suponiendo que toda de una base será etiquetada de una vez, pueden realizarse cuatro reacciones de PCR en las que en cada una, todas las bases de nucleótidos C, T, G o A están etiquetadas de forma fluorescente. Las cadenas se desnaturalizan a continuación formando ADNmc o ARNmc. A continuación, se induce el paso de cada cadena a través de un nanoporo a una velocidad conocida y a través de un área de MaxIF capaz de contener un número conocido de nucleótidos. A medida que los nucleótidos etiquetados pasan a través del CEM, sus posiciones pueden determinarse con respecto a los otros nucleótidos etiquetados - proporcionando un mapa de distancia para cada uno de los cuatro polinucleótidos idénticos pero etiquetados de forma diferente. Estos cuatro mapas de distancia pueden ensamblarse a continuación fácilmente en una secuencia de polinucleótidos completa.

Secuenciación del genoma completo:

Con el fin de secuenciar un genoma usando este método, cebadores aleatorios etiquetados de forma fluorescente, tales como están disponibles para amplificación del genoma completo, podrían usarse. La secuencia de estos cebadores se conocería y la etiqueta fluorescente podría servir para indicar la orientación 5' o 3' del fragmento de ADN a medida que pasa a través del poro. El cebador etiquetado también serviría como un punto de referencia inicial a partir del cual podría relacionarse el mapa de distancia de los nucleótidos etiquetados. Preferentemente, todas o más de una de las cuatro bases estarían etiquetadas de forma fluorescente y se usarían etiquetas fluorescentes con diferentes espectros de emisión para diferenciar estas bases. Más de un espectro de etiqueta

fluorescente también podría usarse para etiquetar todas de un tipo de base, siempre que las etiquetas tuvieran distintos espectros de emisión máxima.

5 A continuación se podría inducir el paso de estos fragmentos de ADN a través del poro tal como se ha descrito anteriormente a una velocidad determinada por la emisión de fotones. Usando el colorante Cy5, las velocidades de emisión de fotones para FIM de entre 3 y 9 millones de fotones/s se han obtenido [1]. Esto podría permitir que el ADN pase a través a una velocidad de ligeramente menos de un millón de bases de nucleótido por segundo por nanoestructura. Una agrupación de nanoestructuras permitiría que esta velocidad se multiplique por el tamaño de la agrupación. Dado que estos cebadores son aleatorios y la posición del mapa de distancias para los fragmentos de ADN dentro del genoma no se conoce, se requeriría software de ensamblaje del genoma completo, tal como se usa para secuenciación aleatoria completa para un alineamiento y ensamblaje precisos.

Ventajas de la presente invención

15 La presente invención proporciona diversas ventajas respecto a otros métodos de secuencia de ADN así como otros métodos de detección de moléculas individuales:

- La invención permite detección de moléculas individuales intensificada.
- La invención puede usarse para determinar la posición y la velocidad de moléculas individuales.
- 20 • Aunque puede usarse PCR para etiquetar de forma fluorescente moléculas individuales, el presente aparato y método no dependen de reacciones químicas o enzimáticas.
- El aparato puede estar dispuesto de forma ordenada, de modo que decenas, cientos, miles o millones de estas nanoestructuras puedan estar funcionando al mismo tiempo.
- La secuenciación de ADN usando el método perfilado anteriormente sería extremadamente rápida. El coste de la secuenciación usando este método estaría limitado al coste de no más de cuatro reactivos de PCR tales como etiquetas fluorescentes, nucleótidos, polimerasas y otros consumibles secundarios.

Métodos de construcción

30 El meollo de la invención se basa en la inducción del paso de una molécula individual a través de un CEM altamente localizado de manera controlada y la detección de la interacción entre la molécula y el CEM. Existen muchos métodos bien investigados para controlar tanto proteínas como polinucleótidos que incluyen geles, poros orgánicos, poros en estado sólido, fijación a perlas, e inmovilización sobre una superficie. Esto permite que se construya una amplia gama de dispositivos que podrían controlar una molécula individual, tal como una proteína o un fragmento de ADN de modo que se le pueda hacer pasar a través de un CEM altamente localizado.

La presente invención permite que se use cualquier superficie, siempre que la resonancia del plasmón inducida por un CEM incidente induzca FIM en una molécula individual etiquetada de forma fluorescente o ERIS, y se pueda inducir el paso de esa molécula individual a través de un área de MaxIF.

40 La presente invención permite cualquier medio de inducción del paso de una molécula individual a través de una región de MaxIF incluyendo microfluídica, electroforesis, o captura con láser.

Donde la fluorescencia es el método de detección seleccionado, la presente invención permite que se use cualquier etiqueta fluorescente que emita fluorescencia a la frecuencia de resonancia del plasmón máxima de la superficie que está siendo usada.

Idealmente, la etiqueta fluorescente tendrá un elevado rendimiento cuántico, bajo tiempo de vida fluorescente, bajo peso molecular, y será incorporada fácilmente por una polimerasa. Preferentemente, los propios nucleótidos son intrínsecamente fluorescentes.

La ERIS tiene la ventaja de que no se requiere ningún etiquetado, sino en su lugar el espectro Raman específico de características de la molécula a identificar debe ser conocido.

55 Estas características permiten que la invención se diseñe de al menos tres maneras generales, teniendo cada una de las cuales ventajas distintas:

- El uso de un poro "orgánico" para controlar una molécula individual permite que nanopartículas de oro se unan covalentemente al propio poro o a los lípidos circundantes. Como alternativa, el poro orgánico puede colocarse dentro de un nanoporo en estado sólido más grande tal como puede hacerse en nitruro de silicio, y la estructura plasmónica (por ejemplo fracción metálica) situarse de modo que FIM o ERIS se optimice para esas moléculas o partes de moléculas dentro del poro orgánico. Como alternativa, un poro orgánico podría colocarse dentro de una estructura plasmónica tal como una nanocavidad fotónica (véase las figuras 5 and 6). Las ventajas de este método incluyen el comportamiento bien caracterizado de moléculas individuales cuyo paso a través de dicho poro se indujo, el pequeño y altamente reproducible diámetro de poro que permite un poro orgánico, y el bajo

coste de producir dichos poros orgánicos.

- El uso de un nanoporo en estado sólido permite el control sobre el diámetro de poro y nanoposicionar estructuras plasmónicas de modo que FIM o ERIS se optimice. Idealmente, la emisión de fotones puede controlarse adicionalmente por medio de una guía de ondas. Esto permitiría una detección de fotones más eficiente y velocidades de detección más elevadas.
- Un tercer método de construcción general es para permitir una distribución aleatoria de CEM altamente localizados, de modo que la intensidad del campo en cualquier punto dado sobre una superficie porosa no se conozca y para permitir que la molécula individual pase a través de esta superficie a una velocidad controlada pero una ubicación incontrolada (figura 7). Esto tiene una tremenda ventaja respecto a los otros dos métodos ya que ni la ubicación ni la distribución de los CEM o las moléculas individuales están controladas de forma precisa, la facilidad con la que dicho dispositivo puede estar construido es correspondientemente mayor. Un método que controla la velocidad de las moléculas individuales en la intersección de un poro de 20 nm y una superficie que contiene CEM distribuidos aleatoriamente se describe a continuación. Este método tiene la ventaja de que es intrínsecamente multiplexado. Incluso si la fluorescencia producida por una molécula individual que pasa a través de un CEM es tal que solamente una molécula puede ser detectada por segundo, el dispositivo puede multiplexarse de modo que varios cientos o miles o millones de poros estén en funcionamiento al mismo tiempo.

Método para la construcción de un aparato de acuerdo con la presente invención y realizar la secuenciación

Un aparato de acuerdo con la presente invención comprende lo siguiente:

- Un primer depósito 19 capaz de alojar varios μ l de solución y que contiene un electrodo 26 embebido en su superficie inferior;
- Una capa de silicio (sustrato) 11 con una agrupación de nanoporos 10, que tienen 20 nm de diámetro y que están separados 1 μ m grabados en su superficie. Los electrodos 12 están embebidos en la capa de silicio 11, de modo que cada poro 10 de 20 nm de diámetro contiene un electrodo 12, y cada electrodo 12 está conectado a un suministro de tensión con una elevada tasa de oblicuidad (no mostrado);
- Una membrana porosa 22, sobre la cual se depositan una agrupación regular de nanopartículas de oro 14, está unida a la capa de silicio. Las nanopartículas de oro 14 son de tamaño y geometría conocidas, y cuando se excitan a la frecuencia apropiada, producen un CEM;
- Un gel 24 tal como agarosa o poliacrilamida se aplica a la membrana 22 que tiene un tamaño de poro promedio de modo que, cuando se induce la migración de ADNmc 20 a través del gel 22, éste adoptará una conformación aproximadamente lineal. Esto forma los medios de control en la presente realización de la invención;
- Un segundo depósito 21 está provisto sobre el otro lado del sustrato 22 en el que una molécula pasará después de haberse desplazado a través del poro;
- Una agrupación de moduladores de tensión (no mostrados) con una elevada tasa de oblicuidad están unidos a un detector de fotones sensibles tales como un fotodiodo de avalancha (no mostrados);
- Se proporciona un detector de fotones tal como un fotodiodo de avalancha (no mostrado);
- Se proporciona un medio de controlar una agrupación de fuentes de tensión basado en la entrada desde un detector de fotones (no mostrado);
- Se proporciona un láser de una frecuencia capaz de inducir resonancia del plasmón en los coloides metálicos de tamaño y geometría conocidas (no mostrado).

Método de funcionamiento para realizar la secuenciación:

El ADN está etiquetado mediante PCR tal como se ha descrito anteriormente, de modo que todas de las dos bases (C y A o G y T) en una cadena dada de ADNmc están etiquetadas de forma fluorescente con etiquetas fluorescentes que tienen una emisión máxima cerca, pero preferentemente desplazada hacia el rojo en relación con la frecuencia con resonancia del plasmón de los coloides metálicos 14 que se están usando.

El ADNmc etiquetado se coloca a continuación en el primer depósito 19. La membrana 22 revestida con un gel nanoporoso 24 y que contiene una distribución aproximadamente uniforme de nanopartículas de oro 14, de modo que la separación entre ellas varíe aleatoriamente entre 1 nm y 100 nm se coloque por encima del primer depósito 19. La capa de silicio 11 se coloca a continuación sobre la membrana 22 y todo el conjunto puede sumergirse en una solución conductora. Una carga positiva es administrada a continuación a los electrodos 12 dentro de los poros de 20 nm 10, de modo que se inducirá la migración del ADNmc 20 a través del segundo depósito 21 al interior del gel 24, paso a través del gel 24 en conformación lineal y paso de la agrupación de nanopartículas de oro 14 que emiten fotones a medida que pasan a través del CEM producido por la resonancia del plasmón. Dado que los cebadores aleatorios etiquetados de forma fluorescente se usaron en la reacción de PCR, la primera emisión de fotones se producirá por el cebador 5' o 3'. La emisión de fotones obtenida a partir del cebador indicará inmediatamente la velocidad a la que se puede inducir la migración del fragmento de ADNmc 20 a través del CEM y seguir obteniéndose una señal clara. Dado que la situación del ADNmc 20 con respecto a las esferas de oro 14 será diferente dentro de cada uno de los poros de 20 nm 10 para cada fragmento de ADNmc 20, habrá una tensión óptima que puede aplicarse a cada poro 10 en cualquier momento dado. Tal como se ha perfilado anteriormente, un mapa de distancia que contiene las distancias relativas entre sí y con respecto a los cebadores conocidos puede crearse a partir de la emisión de fotones data. Estos datos pueden ensamblarse en una secuencia del genoma

completo.

Métodos adicionales para la preparación de un sustrato y realizar la secuenciación

- 5 Existen muchas maneras en las que un sustrato adecuado puede producirse usando técnicas nanotecnológicas. Lo siguiente describe dos posibles maneras y la manera en la que se realizará un protocolo de secuenciación.

Ejemplo 1 - Poro orgánico en una nanocavidad plasmónica (Tal como se ilustra en las figuras 5 y 6)

- 10 1) Una agrupación de estructuras plasmónicas tales como nanocavidades fotónicas 30 están construidas de un material adecuado 32 tal como se describe en [4], teniendo las nanocavidades un diámetro interno de 8 a 10 nm como en la figura 5, o teniendo un diámetro interno de 4 a 5 nm como en la figura 6.
- 15 2) Un poro orgánico 34 tal como α -hemolisina se posiciona a continuación dentro de estas estructuras plasmónicas mediante medios sugeridos en [13] de modo que los poros orgánicos 34 estén separados aproximadamente 1 μ m.
- 3) La longitud de onda de resonancia del plasmón de estas nanocavidades 30 se determina a continuación de forma precisa y espectros láser y de colorante fluorescente se seleccionan para corresponder con la resonancia del plasmón definida. Los espectros de colorante fluorescente deben estar ligeramente desplazados hacia el rojo (20 a 150 meV) desde el pico de resonancia del plasmón.
- 20 4) Se lleva a cabo transporte electrolítico a través del nanoporo orgánico 34 tal como se describe en [10].
- 5) La emisión de fotones desde las etiquetas fluorescentes se detecta usando un sistema de detección de fotodiodo de avalancha bien conocido en la técnica.
- 6) Después de extraer ADN a partir de una fuente genética seleccionada, el ADNmc se etiqueta de forma fluorescente usando PCR y cebadores aleatorios tales como se usan en amplificación del genoma completo. De los cuatro nucleótidos presentes en la reacción de PCR, uno estará presente solamente en su forma modificada por colorante, garantizando un etiquetado fluorescente de alta densidad del nucleótido seleccionado. Con el fin de garantizar un etiquetado de alta densidad con longitudes de lectura largas, se puede tener que ensayar varios colorantes fluorescentes con diversas polimerasas tal como se describe en [7].
- 25 7) Esta reacción de PCR se lleva a cabo a continuación para los tres nucleótidos restantes, de modo que se habrán llevado a cabo cuatro reacciones de PCR, dando como resultado cuatro muestras que contienen ADN etiquetado de forma fluorescente en todos los nucleótidos C, T, G y A respectivamente.
- 8) Inmediatamente antes de que se haga pasar el ADN a través del dispositivo de secuenciación, las reacciones de PCR se desnaturalizan tal como es bien conocido en la técnica, para permitir que el ADNmc etiquetado pase a través de los nanoporos 34.
- 30 9) Se permite pasar una reacción de PCR desnaturalizada cada vez a través del nanoporo 34.
- 10) La emisión de fotones a partir de las moléculas de colorante se obtiene mediante un APD con una precisión de una millonésima de segundo. Las temporizaciones de estas ráfagas de emisión de fotones se normalizan con lo que se conoce respecto a la traslocación de ADNmc a través de un poro y se crean varios miles o millones de mapas de distancia que revelan la separación entre nucleótidos idénticos.
- 40 11) Estos mapas de distancia se reensamblan en primer lugar en cuatro secuencias completamente reensambladas de nucleótidos idénticos, y se componen en una secuencia de genoma completo.

Ejemplo 2 - Nanoporo sintético (tal como se ilustra en la figura 7)

- 45 1) Una agrupación de nanoporos cónicos que tienen un radio interno en la punta de 30 nm o menos se graban mediante ataque químico en una membrana de nitruro de silicio semiconductor o de metal conductora 40 usando litografía por haz de electrones bien conocida en la técnica. Estos nanoporos están separados 1 μ m. La membrana de silicio grabada se instala sobre una plataforma tal como se describe en [11] y se coloca en líquido de galvanoplastia en un pequeño tubo de Teflon (2 mm de diámetro), que funciona como un baño de galvanoplastia. Como líquido de galvanoplastia se usa TEMPEREX 8400 (Tanaka Kikinzoku), que incluía el 1,17 % (p/p) de KAu(CN)₂, a temperatura ambiente. Un alambre de oro (0,5 mm de diámetro) se sumergió en la solución como contraelectrodo. A continuación, se aplica una tensión de polarización de 1,4 a 1,5 V a los electrodos iniciales con respecto al contraelectrodo en el sistema. A esto le sigue la electrodeposición de oro sobre la superficie de los electrodos iniciales. Normalmente, una corriente de inducción de 0,2 mA permite una
- 50 tasa de electrodeposición de 1 A^o/s a temperatura ambiente.
- 2) A continuación se deposita una capa de oro 42 usando electrodeposición tal como se describe en [11] para producir un poro de 1,5 a 2,5 nm de diámetro. Cuando es excitada por una onda incidente de la longitud de onda apropiada, esta estructura producirá un CEM altamente localizado concentrado en la punta del poro cónico [12].
- 3) A medida que se induce la migración del ADNmc etiquetado a través del poro 44 por electroforesis, etiquetas individuales entran en contacto con el borde 43 del poro 44. Dado que el CEM está altamente localizado alrededor del borde del poro 44, a medida que una etiqueta fluorescente pasa a través del campo, se esperaría emisión de fotones. El contacto entre la superficie de oro en la punta del poro 44 y el ADNmc etiquetado de forma fluorescente, sin embargo, induce extinción fluorescente. A medida que el ADNmc etiquetado sigue moviéndose pasada la punta del poro y al interior del canal, el canal se expande. Esta expansión elimina el
- 65 contacto con la superficie de la estructura plasmónica y la extinción fluorescente resultante.
- 4) La longitud de onda de resonancia plasmónica de estos poros cónicos electrodepositados 44 se determina a

continuación de forma precisa y espectros láser y de colorante fluorescente se seleccionan para corresponder con la resonancia del plasmón definida. Los espectros de colorante fluorescente deben estar ligeramente desplazados hacia el rojo (20 a 150 meV) desde el pico de resonancia del plasmón.

5) Se lleva a cabo transporte electrolítico a través del nanoporo cónico 44 tal como se describe en [8, 9].

6) La emisión de fotones desde las etiquetas fluorescentes se detecta usando un sistema de detección de fotodiodo de avalancha bien conocido en la técnica.

7) Después de extraer ADN a partir de una fuente genética seleccionada, el ADNmc se etiqueta de forma fluorescente usando PCR y cebadores aleatorios tales como se usan en amplificación del genoma completo. De los cuatro nucleótidos presentes en la reacción de PCR, uno estará presente solamente en su forma modificada por colorante, garantizando etiquetado fluorescente de alta densidad del nucleótido seleccionado. Con el fin de garantizar etiquetado de alta densidad con longitudes de lectura largas, se puede tener que ensayar varios colorantes fluorescentes con diversas polimerasas tal como se describe en [7].

8) Esta reacción de PCR se lleva a cabo a continuación para los tres nucleótidos restantes, de modo que se habrán llevado a cabo cuatro reacciones de PCR, dando como resultado cuatro muestras que contienen ADN etiquetado de forma fluorescente en todos de los nucleótidos C, T, G y A respectivamente.

9) Inmediatamente antes de que se haga pasar el ADN a través del dispositivo de secuenciación, las reacciones de PCR se desnaturalizan tal como es bien conocido en la técnica, para permitir que el ADNmc etiquetado pase a través de los nanoporos 44.

10) Se permite pasar una reacción de PCR desnaturalizada cada vez a través del nanoporo 44.

11) La emisión de fotones a partir de las moléculas de colorante se obtiene mediante un APD con una precisión de una millonésima de segundo. Las temporizaciones de estas ráfagas de emisión de fotones se normalizan con lo que se conoce respecto a la traslocación de ADNmc a través de un poro 44 y se crean varios miles o millones de mapas de distancia que revelan la separación entre nucleótidos idénticos.

12) Estos mapas de distancia se reensamblan en primer lugar en cuatro secuencias completamente reensambladas de nucleótidos idénticos, y se componen en una secuencia de genoma completo.

Referencias:

- [1] Fu, Yi, Lakowicz; Joseph R., "Single molecule studies of enhanced fluorescence on silver island films", Plasmonics, Vol. 2, N.º 1, 2007.
- [2] Nakamura, Toshihiro; Hayashi, Shinji, "Enhancement of dye fluorescence by gold nanoparticles: Analysis of Particle Size.
- [3] Pompa, P.P. et al, "Metal enhanced fluorescence of colloidal nanocrystals with nanoscale control", Nature, publicado en línea el 3 de noviembre de 2006.
- [4] Netti, M. Caterina et al, "Confined plasmons in gold photonic nanocavities", Advanced Materials, Vol. 13, N.º 18, 2001.
- [5] Aizpurua, J. et al, "Optical properties of gold nanorings", Physics Review Letters, Vol. 90, N.º 5, 2003.
- [6] Kucheyev, S.O. et al, "Surface-enhanced Raman scattering on nanoporous Au", Applied Physics Letters, Vol. 89, 2006.
- [7] Taurai, Tasara et al, "Incorporation of reporter molecule-labelled nucleotides by DNA polymerases. II. High-density labelling of natural DNA", Nucleic Acids Research, Vol. 31, N.º 10, 2003.
- [8] Heng, J.B. et al, "The Electromechanics of DNA in a synthetic nanopore", Biophysical Journal, Vol. 90, febrero de 2006.
- [9] Ho, Chuen et al, "Electrolytic transport through a synthetic nanometer-diameter Pore", PNAS, Vol. 102, N.º 30, 2005.
- [10] Astier, Yann; Braha, Orit; Bayley, Hagan, "Towards single molecule DNA sequencing", Journal of American Chemical Society, Vol. 128, 2006.
- [11] Kashimura, Yoshiaki et al, "Fabrication of nano-gap electrodes using electroplating technique" Thin Solid Films 438 - 439, 2003.
- [12] Downes, Andrew; Salter, Donald; Elfick, Alistair, "Simulations of atomic resolution tip-enhanced optical microscopy" OPTICS EXPRESS, Vol. 14, N.º 23, 2006.
- [13] Bayley, Hagan; Cremer, Paul S., "Stochastic sensors inspired by biology", NATURE, Vol. 413, septiembre de 2001.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para investigar una molécula (20) que comprende:

- 5 - dos depósitos separados entre sí por un sustrato (11), el primer depósito (19) adecuado para recibir una muestra que comprende la molécula (20) a investigar, y un segundo depósito (21) adecuado para que la molécula (20) pase a su interior una vez que ha pasado a través de al menos un canal (10) provisto en el sustrato (11), siendo el canal (10) adecuado para el paso de la molécula (20) a su través;
- 10 - al menos una nanopartícula metálica (14) capaz de generar un campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón;
- medios para inducir el paso de una molécula (20) a través del canal (10);
- medios para inducir resonancia del plasmón en la nanopartícula metálica (14); y
- medios para detectar interacción entre el campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón producido por la nanopartícula metálica (14) y una molécula (20) que pasa a través del canal (10),

- 15 caracterizado por que:
- el al menos un canal es un nanoporo (10) que tiene un diámetro de 0,5 nm a 100 nm; y
- 20 - la al menos una nanopartícula metálica (14) está ubicada sobre el sustrato (11) adyacente a dicho nanoporo (10) y dispuesta en una posición adecuada para que el campo electromagnético producido por la nanopartícula metálica (14) interactúe con una molécula (20) que pasa a través del nanoporo (10).

2. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el nanoporo (10) tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 nm a 50 nm.

25 3. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que el nanoporo (10) tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 nm a 30 nm.

30 4. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que el nanoporo (10) tiene un diámetro de 1 nm a 5 nm.

5. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el nanoporo (10) es orgánico.

35 6. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el sustrato (11) está dotado de una pluralidad de nanoporos (10).

40 7. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la nanopartícula metálica (14) está hecha de oro, plata, cobre o aluminio.

8. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la nanopartícula metálica (14) es sustancialmente esférica o sustancialmente anular; o es un prisma poligonal.

45 9. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la nanopartícula metálica (14) tiene un diámetro de 50 nm a 150 nm.

50 10. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la nanopartícula metálica (14) está situada para estar a 50 nm o menos de la molécula (20) a medida que pasa a través del nanoporo (10).

11. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la nanopartícula (14) está situada para estar a 10 nm o menos de la molécula (20) a medida que pasa a través del nanoporo (10).

55 12. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los medios para inducir el paso de una molécula (20) a través del nanoporo (10) comprenden uno o más de medios para inducir electroforesis, un dispositivo microfluídico, o un dispositivo de captura con láser.

60 13. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende además medios de control para controlar el paso de la molécula (20) a través del nanoporo (10).

14. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la interacción entre el campo electromagnético y la molécula (20) genera fluorescencia o luz con dispersión Raman.

65 15. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los medios para detectar la interacción entre el campo electromagnético y la molécula (20) se seleccionan entre un fotomultiplicador, un fotodiodo de avalancha y un espectrómetro Raman.

16. Un método para investigar una molécula (20) que comprende las etapas de:

- proporcionar una muestra de fluido que comprende una molécula (20) a investigar, en el que la molécula (20) es opcionalmente una molécula biológica (20) y opcionalmente un ácido nucleico;
- inducir el paso de dicha molécula (20) a través de un nanoporo (10) provisto en un sustrato (11), teniendo el nanoporo (10) un diámetro de 0,5 nm a 100 nm, en el que una nanopartícula metálica (14) está ubicada sobre el sustrato (11) adyacente a la abertura de un nanoporo (10) y se le induce la generación de un campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón; y
- detectar interacción entre el campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón producido por la nanopartícula metálica (14) y la molécula (20) a medida que pasa a través del nanoporo (10).

17. El método de la reivindicación 16, que comprende las etapas de:

- proporcionar una muestra de fluido que comprende el ácido nucleico (20) a secuenciar, opcionalmente en el que todas de una o más de las cuatro bases en el ácido nucleico (20) está etiquetada con un fluoróforo;
- inducir el paso de una única molécula de ácido nucleico (20) en una conformación lineal a través de un nanoporo (10) en un sustrato (22), teniendo el nanoporo (10) un diámetro de 0,5-100 nm y teniendo opcionalmente un diámetro de 1-50 nm, en el que una nanopartícula metálica (14) está ubicada sobre el sustrato (11) adyacente a la abertura de un nanoporo (10) y se le induce la generación de un campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón; y
- detectar interacción entre el campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón producido por la nanopartícula metálica (14) y la única molécula de ácido nucleico (20) a medida que pasa a través del nanoporo (10).

18. El método de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en el que la molécula (20) comprende una etiqueta que interactúa con la nanopartícula metálica (14), opcionalmente en el que la etiqueta es un fluoróforo, opcionalmente seleccionado entre Rosa de Bengala, C₅-maleimida, C₂-maleimida, Rojo Rodamina, C₂-maleimida, y Verde Rodamina, y opcionalmente en el que la etiqueta tiene un pico de emisión a una energía ligeramente inferior que el pico de resonancia del plasmón localizado de la nanopartícula metálica (14).

19. Un sustrato (11) adecuado para uso en un aparato para investigar una molécula (20) que comprende:

- al menos un canal (10) provisto en el sustrato (11), el canal (10) adecuado para el paso de una molécula (20) a su través; y
- al menos una nanopartícula metálica (14) capaz de generar un campo electromagnético derivado de resonancia del plasmón,

caracterizado por que:

- el al menos un nanoporo (10) tiene un diámetro de 0,5 nm a 100 nm; y
- la al menos una nanopartícula metálica (14) está ubicada sobre el sustrato (11) adyacente a la abertura del nanoporo (10) para estar a 50 nm o menos de la molécula (20) a medida que pasa a través del nanoporo y dispuesta en una posición tal que el campo electromagnético producido por la nanopartícula metálica (14) sea capaz de interactuar con una molécula (20) que pasa a su través.

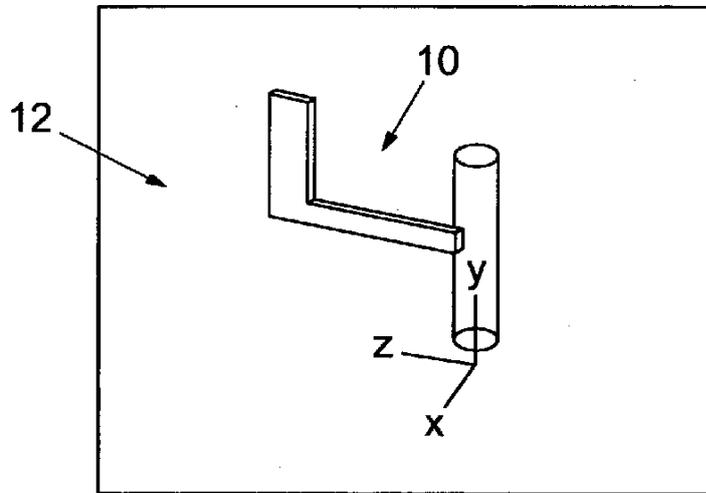


Fig. 1

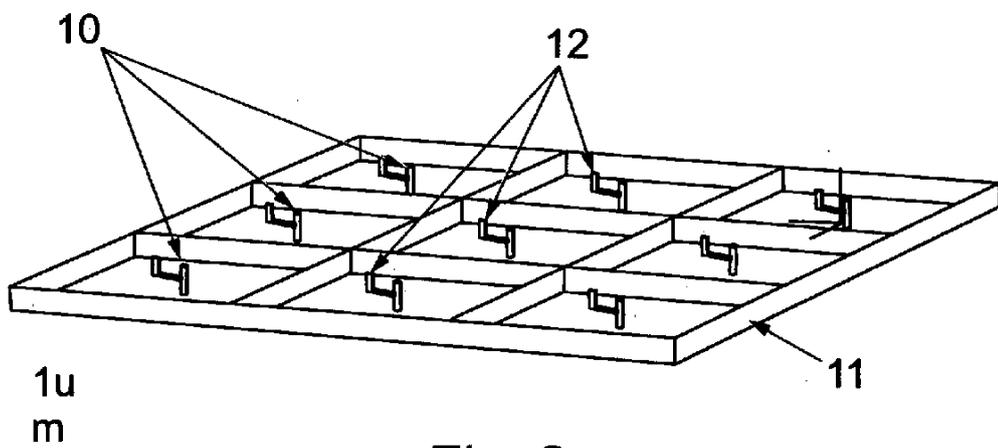


Fig. 2

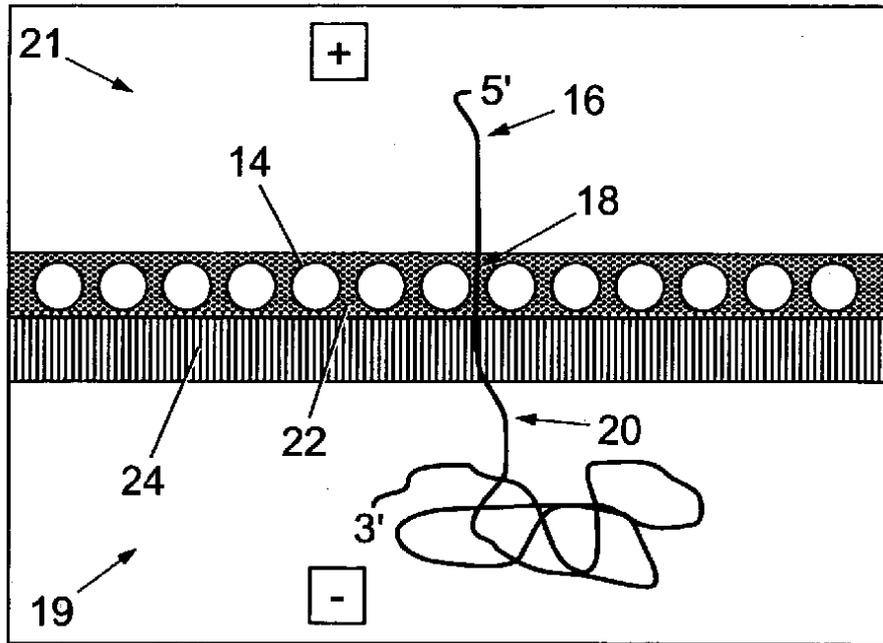


Fig. 3

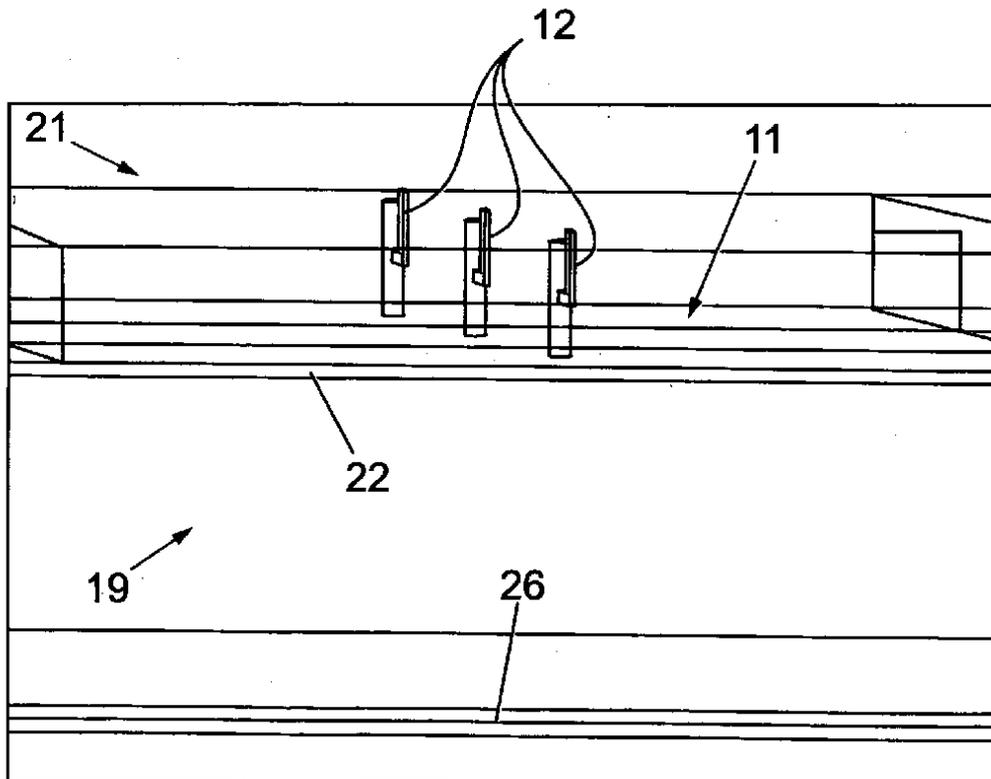


Fig. 4

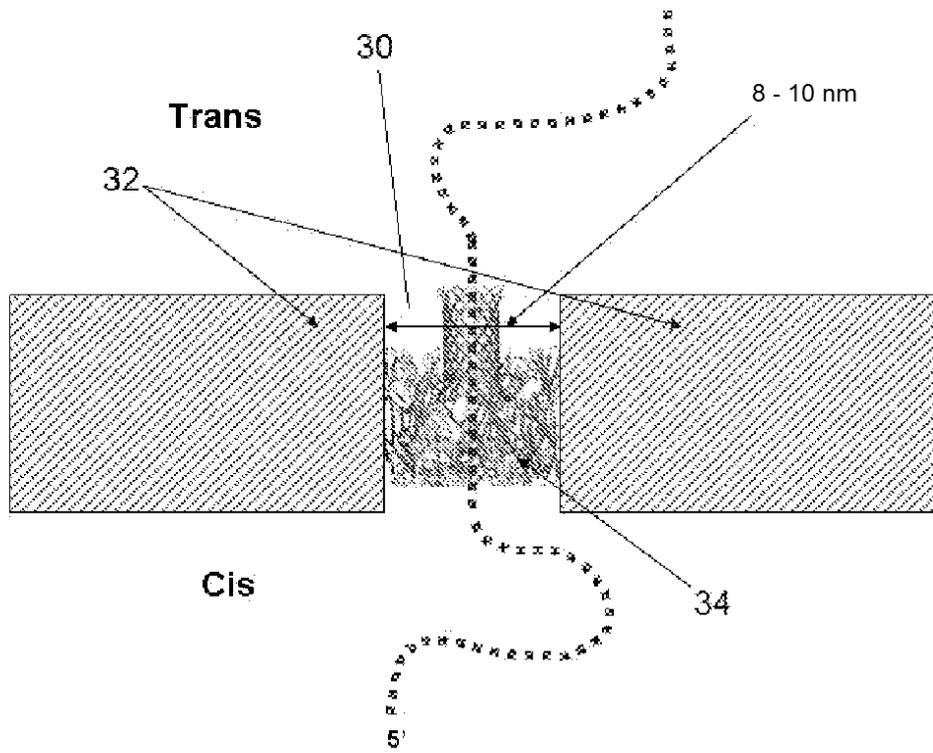


Fig. 5

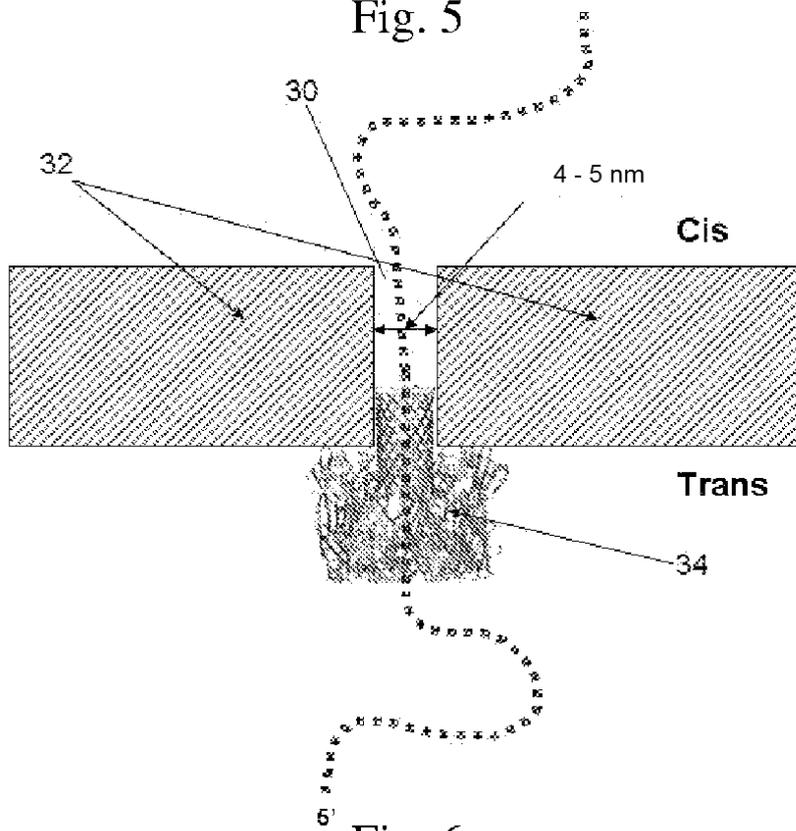


Fig. 6

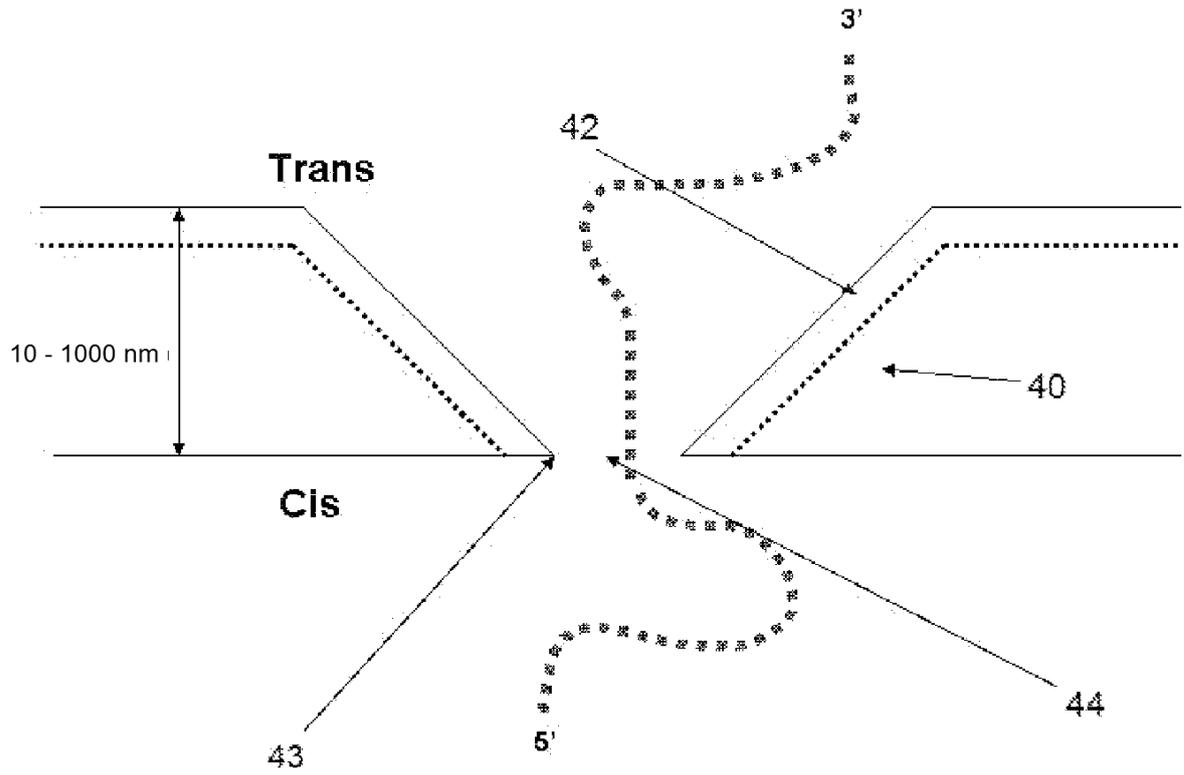


Fig. 7