(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 629 952**

(51) Int. CI.:

B81C 1/00 (2006.01)
C25F 3/14 (2006.01)
B01D 67/00 (2006.01)
B01D 65/02 (2006.01)
G01B 7/00 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2013 PCT/IB2013/000884**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167952**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2013 E 13787360 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2846901**

(54) Título: **Procedimiento para controlar el tamaño de nanoporos de estado sólido**

(30) Prioridad:

07.05.2012 US 201261643651 P
14.03.2013 US 201361781081 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2017

(73) Titular/es:

THE UNIVERSITY OF OTTAWA (100.0%)
3042-800 King Edward
Ottawa, Ontario K1N 6N5, CA

(72) Inventor/es:

GODIN, MICHEL;
BEAMISH, ERIC;
TABARD-COSSA, VINCENT y
KWOK, WING HEI

(74) Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

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

Procedimiento para controlar el tamaño de nanoporos de estado sólido

Campo

La presente divulgación versa sobre una técnica para adaptar el tamaño de un nanoporo de estado sólido usando campos eléctricos potentes.

Antecedentes

Los nanoporos biológicos y de estado sólido proporcionan un medio de detección de analitos biomoleculares en el ámbito de una sola molécula. Normalmente, los nanoporos individuales están embebidos en membranas aislantes delgadas, que proporcionan el único conducto para que una corriente iónica pase entre dos reservorios de líquidos. Utilizando los principios de contadores Coulter de mayor escala, los experimentos con nanoporos relacionan cambios en la corriente iónica para determinar, la longitud, el tamaño, la carga y la conformación de biomoléculas cargadas cuando son conducidas electroforéticamente a través de un nanoporo en presencia de un campo eléctrico externo.

Aunque los nanoporos biológicos tales como los de la α-hemolisina normalmente ofrecen mayor sensibilidad y propiedades de bajo ruido, la bicapa lipídica de soporte es frágil y de tamaño fijo, lo que limita la aplicabilidad de los mismos. Los nanoporos de estado sólido, en cambio, son normalmente fabricados en membranas aislantes delgadas (10-50 nm), tales como membranas de nitruro de silicio o de óxido de silicio, y pueden ser fabricadas de diferentes tamaños, ser fácilmente integradas con tecnologías a escala de oblea, y son más robustas, permitiendo una gama más amplia de condiciones experimentales. A pesar de estas ventajas, las tecnologías de nanoporos de estado sólido adolecen de varios inconvenientes prácticos que limitan su utilidad para estudios biomoleculares. Aunque el control del tamaño de un nanoporo es posible, es normalmente caro y laborioso de lograr, requiriendo equipo especializado y personal experto. Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que los nanoporos perforados mediante un haz enfocado de iones encogen en condiciones experimentales específicas en un microscopio electrónico de barrido (SEM). En otros planteamientos, los nanoporos perforados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) pueden expandirse o encoger dependiendo de las condiciones del haz y de la exposición posterior a disolventes acuosos. En estos casos, la gama obtenible de tamaños de nanoporo es limitada, difícil de controlar e incluso poco fiables, ya que el tamaño del nanoporo puede cambiar tras un tratamiento químico o cuando es sumergido en un entorno líquido particular.

El documento US 2012/0103821 A1 da a conocer pasos nanofluídicos tales como nanocanales y nanoporos que se cierran y se abren de manera controlada a través del uso de un sistema de información de retorno. Se desarrolla o se elimina una capa de óxido dentro de un paso en presencia de un electrolito hasta que el paso alcance las dimensiones seleccionadas o se cierre. Durante la fabricación se mide el cambio de dimensiones del paso nanofluídico. El nivel de la corriente iónica a través del paso puede ser usado para determinar las dimensiones del paso. El flujo de fluido a través de un conjunto de elementos fluídicos puede ser controlado mediante la oxidación selectiva de los pasos fluídicos entre elementos.

La corriente iónica a través de nanoporos de estado sólido también puede adolecer de un grado elevado de ruido, las fuentes del cual son un tema intensamente investigado en la bibliografía sobre nanoporos. Aunque se han propuesto diversos procedimientos para reducir el ruido eléctrico, la producción de nanoporos estables fiables de bajo ruido normalmente sigue siendo normalmente muy baja. La deposición de residuos carbonáceos durante la perforación y la formación de imágenes puede tener efectos perjudiciales en la calidad de las señales eléctricas, haciendo a menudo un reto de la completa humectación y causando la formación de nanoburbujas que pueden ser difíciles de eliminar. Además, la obstrucción del nanoporo por las moléculas de analitos degrada la calidad de las señales, haciendo los poros inútiles para un experimento ulterior. Estos efectos reducen muchísimo la producción de dispositivos de nanoporos funcionales y aumentan el coste asociado con la investigación de nanoporos de estado sólido. Así, la fabricación reproducible y la adaptación de nanoporos fiables siguen siendo un reto no solo para el entorno de la investigación académica, sino para la comercialización de cualquier tecnología basada en nanoporos.

Esta sección proporciona información de antecedentes relacionada con la presente divulgación que no es necesariamente técnica anterior.

Sumario

Esta sección proporciona un sumario general de la divulgación, y no es una divulgación exhaustiva de todo su alcance ni de todas sus características.

Se proporciona un procedimiento para la adaptación de un nanoporo formado en una membrana de estado sólido. El procedimiento incluye: aplicar un potencial eléctrico en todo el nanoporo, teniendo el potencial eléctrico una forma de onda de impulsos que oscila entre un valor elevado y un valor bajo; medir que corriente que fluye a través del

nanoporo; determinar el tamaño del nanoporo en función, en parte, de la corriente medida; y eliminar el potencial eléctrico aplicado en todo el nanoporo cuando el tamaño del nanoporo corresponde a un tamaño deseado.

En un aspecto de la divulgación, la medición de la corriente que fluye a través del nanoporo se produce mientras el potencial eléctrico está siendo aplicado con un valor elevado, mientras que, en otro aspecto, la medición de la corriente que fluye a través del nanoporo se produce mientras el potencial eléctrico está siendo aplicado con un valor bajo.

En un aspecto de la divulgación, el procedimiento está definido, además, incluyendo: seleccionar un valor para un potencial eléctrico que induce un campo eléctrico en un nanoporo y aplicar el potencial eléctrico durante un periodo de tiempo predeterminado, siendo el campo eléctrico de aproximadamente 0,3 voltios por nanómetro. Después del periodo de tiempo predeterminado, el potencial eléctrico aplicado en todo el nanoporo es reducido hasta un valor menor que el valor seleccionado y la corriente que fluye a través del nanoporo es medida mientras el potencial eléctrico es aplicado al valor reducido. El tamaño del nanoporo se determina en función, en parte, de la corriente medida.

En algunos aspectos de la divulgación, este procedimiento se repite hasta que la corriente medida supere un umbral. Cuando se reaplica un potencial eléctrico relativamente elevado, la polaridad del potencial eléctrico puede invertirse para lograr o mantener la simetría en la geometría de los poros. Una vez la corriente medida supera el umbral, se elimina el potencial eléctrico.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para aumentar con precisión el tamaño de un nanoporo formado en una membrana, que comprende: aplicar un potencial eléctrico en todo el nanoporo dispuesto en una solución iónica, teniendo el potencial eléctrico una forma de onda de impulsos que oscila entre un valor elevado y un valor bajo; medir la corriente que fluye a través de un nanoporo mientras el potencial eléctrico está siendo aplicado en todo el nanoporo con un valor bajo; determinar el tamaño del nanoporo en función, en parte, de la corriente medida; y eliminar el potencial eléctrico aplicado al nanoporo cuando el tamaño del nanoporo corresponde a un tamaño deseado. El procedimiento puede comprender seleccionar el valor elevado para el potencial eléctrico de modo que el campo eléctrico se encuentre en un intervalo de 0,1 voltios por nanómetro a 0,4 voltios por nanómetro. Además, el procedimiento puede comprender seleccionar el valor bajo para el potencial eléctrico de modo que el campo eléctrico sea inferior a 0,1 voltios por nanómetro. El procedimiento, puede comprender determinar el tamaño del nanoporo e incluye la comparación de la corriente medida con un umbral y la eliminación del potencial eléctrico en todo el nanoporo cuando la corriente medida supera el umbral. El procedimiento puede comprender alternar la polaridad de un valor elevado entre un valor positivo y un valor negativo por cada dos impulsos.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para aumentar con precisión el tamaño de un nanoporo formado en una membrana, que comprende: seleccionar un valor para un potencial eléctrico que induce un campo eléctrico en un nanoporo, siendo el campo eléctrico de más de 0,1 voltios por nanómetro; aplicar un potencial eléctrico del valor seleccionado en todo un nanoporo dispuesto en una solución iónica; medir la corriente que fluye a través del nanoporo mientras el potencial eléctrico es aplicado en todo el nanoporo; estimar el tamaño del nanoporo en función, en parte, de la corriente medida; y eliminar el potencial eléctrico aplicado en todo el nanoporo cuando la corriente medida supera un umbral. El procedimiento puede comprender reducir el potencial eléctrico aplicado en todo el nanoporo hasta un valor menor que el valor seleccionado; medir la corriente que fluye a través del nanoporo mientras el potencial eléctrico es aplicado con el valor reducido; y determinar el tamaño del nanoporo en función, en parte, de la corriente medida mientras el potencial eléctrico es aplicado al valor reducido. El procedimiento puede comprender seleccionar el valor del potencial eléctrico de modo que el campo eléctrico sea de aproximadamente 0,3 voltios por nanómetro. El procedimiento puede comprender seleccionar el potencial eléctrico de modo que el campo eléctrico se encuentre en un intervalo de 0,10 voltios por nanómetro a 0,4 voltios por nanómetro.

Se harán evidentes áreas adicionales de aplicabilidad a partir de la descripción proporcionada en la presente memoria. La descripción y los ejemplos específicos de este sumario están pensados únicamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación.

Dibujos

Los dibujos descritos en la presente memoria tienen únicamente fines ilustrativos de realizaciones seleccionadas y no de todas las implementaciones posibles, y no se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación.

La Figura 1 es un diagrama de flujo que representa una técnica ejemplar para adaptar el tamaño de un nanoporo;

la Figura 2 es un diagrama que representa una configuración ejemplar para adaptar nanoporos;

las Figuras 3A y 3B son gráficos que ilustran trazas de corriente antes y después de la aplicación de campos eléctricos potentes, respectivamente;

la Figura 4A es un gráfico que ilustra la forma de onda de impulsos del potencial eléctrico aplicado en todo el nanoporo, y la corriente iónica creciente a través del nanoporo, que indica crecimiento;

la Figura 4B es un gráfico que ilustra que la tasa de crecimiento puede ser controlada variando el potencial aplicado;

la Figura 4C es un gráfico que ilustra que la tasa de crecimiento puede ser controlada variando la fuerza iónica de la solución;

la Figura 5 es un gráfico que ilustra las mediciones I-V de la conductancia, que confirman que los tamaños de nanoporo han aumentado;

la Figura 6 es un gráfico que ilustra trazas de corriente asociadas con la translocación de moléculas de ADN;

las Figuras 7A y 7B son histogramas del bloqueo de corriente durante los eventos de translocación para poros de 11 nm y 32 nm, respectivamente; y

la Figura 8 es un gráfico que ilustra la efectividad del agrandamiento de nanoporos en diferentes condiciones. En este caso, el grosor de la membrana fue de 10 nm.

Los números de referencia correspondientes indican partes correspondientes en la totalidad de las diversas vistas de los dibujos.

Descripción detallada

Ahora se describirán más completamente realizaciones ejemplares con referencia a los dibujos adjuntos.

La Figura 1 ilustra una técnica ejemplar para adaptar el tamaño de un nanoporo preformado en una membrana. Se usa la aplicación de campos eléctricos potentes para agrandar con precisión el tamaño de los nanoporos mientras se garantiza un rendimiento óptimo de bajo ruido. Se producen campos eléctricos potentes, según se indica en 12, aplicando un potencial eléctrico en todo el nanoporo. El valor del potencial eléctrico es seleccionado para inducir un campo eléctrico que es de más de 0,1 voltios por nanómetro (normalmente entre 0,1 y 0,4 voltios por nanómetro). Aunque en lo que antecede se proporcionan valores particulares, el campo eléctrico inducido variará dependiendo del material de la membrana y de otros factores, pero supera el intervalo óhmico del nanoporo que está siendo acondicionado (normalmente de más de 0,1 voltios por nanómetro).

La exposición prolongada a campos eléctricos potentes inicia la eliminación del material de la membrana que constituye la pared del poro, lo que da como resultado un aumento en el diámetro del nanoporo. Este aumento puede ser controlado de manera precisa adaptando la fuerza y la duración del campo eléctrico. El potencial eléctrico relativamente elevado es aplicado en todo el nanoporo durante un periodo de tiempo predeterminado, según se indica en 13. En una realización, el periodo de tiempo se encuentra en el intervalo de 100 milisegundos a 5 segundos. En otras realizaciones, el periodo de tiempo puede ser mucho menor (por ejemplo, algunos microsegundos) o mucho mayor (por ejemplo, algunos minutos). Después de que finaliza el periodo de tiempo, el potencial eléctrico aplicado en todo el nanoporo es reducido, en 14, hasta un valor menor que el valor relativamente elevado. Por ejemplo, el potencial eléctrico puede ser reducido hasta un valor que induzca un campo eléctrico en el intervalo de cero a 0,1 voltios por nanómetro.

Mientras el potencial eléctrico reducido es aplicado en todo el nanoporo, se mide la corriente que fluye a través del nanoporo, en 15, correlacionándose la corriente medida con el tamaño del nanoporo, según se explica de forma adicional posteriormente. En algunas realizaciones, el potencial eléctrico es aplicado como una serie de impulsos con una medición entre cada impulso. En otras realizaciones, la medición de corriente sigue a un grupo de impulsos (por ejemplo, después de cada n impulsos, siendo n mayor que 1).

En un planteamiento alternativo, la corriente que fluye a través del nanoporo es medida mientras el potencial eléctrico aplicado permanece elevado. La corriente medida proporciona una estimación menos precisa del tamaño de un nanoporo, dado que el campo eléctrico está por encima del intervalo óhmico del sistema de nanoporos. Así, a medida que el tamaño del nanoporo se aproxima al tamaño deseado, el potencial eléctrico es aplicado en forma de impulsos, según se ha descrito anteriormente, de modo que la corriente es medida con el potencial eléctrico reducido.

Cuando el tamaño del nanoporo es equivalente a un tamaño deseado, se elimina el potencial eléctrico aplicado al nanoporo. En una realización ejemplar, el tamaño del nanoporo es determinado comparando, 16, la corriente medida con una corriente umbral, seleccionándose la corriente umbral para que se corresponda al tamaño deseado. El potencial eléctrico se elimina en 17 cuando la corriente medida es igual al umbral o lo supera; si no, se repite entonces el proceso de aplicar un potencial elevado de agrandamiento seguido por un potencial menor de medición hasta que se satisface la condición. Mediante la aplicación cíclica de impulsos de tensión relativamente elevada, se produce una superficie de nanoporo limpia de bajo ruido ideal para estudios monomoleculares. Dado que las trazas de corriente se degradan en el curso de un experimento debido a la obstrucción del nanoporo al absorberse moléculas en la superficie del nanoporo, este procedimiento puede repetirse para recuperar dispositivo obstruidos que, en otro caso, habrían sido descartados. Por ello, la producción de nanoporos funcionales se ve aumentada adicionalmente por la capacidad de usar el mismo dispositivo múltiples veces. Esta técnica proporciona varias

ventajas, ya que se lleva a cabo rápidamente en líquido en condiciones experimentales, requiere únicamente equipo estándar de laboratorio, puede ser automatizada con soporte lógico y produce nanoporos funcionales de alta calidad con un rendimiento de más del 95%.

Aunque membranas que tienen diferentes grosores se encuentran dentro del alcance de esta divulgación, los nanoporos estudiados en esta divulgación fueron perforados en membranas de nitruro de silicio de 30 nm o 10 nm de grosor. También se encuentran dentro del alcance de esta divulgación membranas que comprenden otros materiales dieléctricos (por ejemplo, otros óxidos y nitruros), que son usados comúnmente como materiales de puerta para transistores. Asimismo, las membranas pueden comprender otros materiales tales como el grafeno, el nitruro de boro y similares.

Aunque el protocolo aquí descrito puede ser aplicado a nanoporos de estado sólido de diversos materiales fabricados usando cualquier procedimiento, comúnmente son perforados mediante TEM usando protocolos establecidos previamente. Los nanoporos usados para los experimentos aquí descritos son perforados mediante TEM y normalmente están entre 4 nm y 10 nm de diámetro. Aunque se montaron y acondicionaron membranas tanto de 30 nm como de 10 nm de grosor usando el protocolo definido posteriormente, las polarizaciones de tensión aquí descritas se refieren a las requeridas para membranas de 30 nm de grosor, a no ser que se indique otra cosa. Para membranas de grosores diferentes, la tensión aplicada debería ser ajustada en consecuencia para generar un campo eléctrico en el intervalo de 0,1-0,4 voltios por nanómetro (por encima del límite óhmico) dentro del nanoporo.

Una vez que un nanoporo existe en una membrana aislante, puede montarse directamente en la pila de líquido sin procesamiento ni limpieza adicionales. Sin embargo, si es necesario eliminar trazas de contaminantes entre experimentos, o en algunos casos de obstrucción severa, los chips con nanoporos pueden ser limpiados o usando solución piraña (3:1 H_2SO_4:H_2O_2) o mediante exposición a plasma de oxígeno. También se puede usar este procedimiento para eliminar cualquier contaminación sobrante de los procesos de perforación, formación de imágenes y manipulación que hacen la superficie del nanoporo hidrófila para contribuir a su humectación o para eliminar una obstrucción particularmente persistente. No obstante, la mayoría de dispositivos podría ser reacondicionada *in situ* tras una obstrucción, usando el procedimiento descrito en la presente memoria, reduciendo en consecuencia el tiempo de preparación y la necesidad de manejar productos químicos fuertes.

La Figura 2 representa una configuración ejemplar para adaptar nanoporos preformados en una membrana. La configuración comprende generalmente una pila fluídica 22; un par de electrodos 24 (por ejemplo, Ag/AgCl) eléctricamente acoplados a un circuito amplificador 25 de corriente; y un controlador 26 interconectado con el circuito amplificador 25 de corriente. La pila fluídica 22 está definida adicionalmente por dos reservorios 21 acoplados fluídicamente entre sí mediante un paso, actuando el propio nanoporo como el único conducto para la corriente iónica entre los dos reservorios. Los reservorios pueden ser llenados con una solución acuosa (por ejemplo, una sal a base de cloruro), una solución no acuosa (por ejemplo, LiCl en etanol) u otros tipos de soluciones iónicas.

El circuito amplificador 25 de corriente opera creando un potencial entre los electrodos y midiendo el flujo de corriente a través del nanoporo. En algunas realizaciones, el controlador 26 puede ser implementado mediante un circuito 28 de adquisición de datos acoplado a un ordenador personal 27 u otro tipo de dispositivo de cálculo. Así, la configuración es similar a lo que se usa comúnmente para la detección biomolecular. Esta divulgación contempla otras configuraciones para adaptar un nanoporo.

En la configuración ejemplar, se usa una pila nanoporosa 22 para alojar un chip 32 de silicio que, a su vez, aloja la membrana 30 que contiene un nanoporo. Un protocolo ejemplar para montar el chip 32 de silicio en la configuración es como sigue. Limpiar la pila nanoporosa 22 poniéndola en una solución ácida de ácido nítrico al 20% e hirviendo durante 10 minutos. Extraer cuidadosamente la pila 22 del ácido nítrico y ponerla en agua desionizada en ebullición durante 10 minutos. Extraer la pila 22 y seguir hirviendo en agua desionizada nueva durante 10 minutos más para garantizar la completa eliminación del ácido nítrico. Quitar el vaso de precipitados de la placa caliente y dejarlo enfriar hasta la temperatura ambiente. Extraer la pila 22 del vaso de precipitados y secar por soplado con aire filtrado o N_2. Almacenar la pila 22 en una placa de Petri limpia. Desgasificar la solución electrolítica filtrada tamponada poniéndola al vacío en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos a 40°C. Aunque pueden usarse diversas soluciones salinas de diferentes pH para el acondicionamiento y agrandamiento del nanoporo, la mayoría de los experimentos aquí descritos se lleva a cabo en una solución 1 M KCl tamponada con HEPES a un pH 8. Limpiar dos juntas elastoméricas de silicona para el chip 32 de silicio mediante ultrasonidos en etanol durante al menos 10 minutos. Colocar el chip 32 sobre una junta elastomérica limpia teniendo cuidado de alinear la ventana de la membrana con la abertura de la junta. Colocar y alinear una segunda junta encima del chip 32. Colocar el chip 32 y las juntas sobre la entrada del reservorio de una mitad de la pila nanoporosa 22 limpiada. Ensamblar la pila 22 atornillando la otra mitad en su sitio. Mojar el chip 32 echando en los reservorios de la pila etanol con una pipeta y poner en una cámara de vacío hasta que se vean algunas burbujas salir por las entradas. Eliminar el etanol lavando los reservorios con al menos 3 ml de una solución electrolítica desgasificada filtrada. Tener cuidado de eliminar el rebose usando un aspirador. El chip 32 de silicio es montado entonces entre los dos reservorios 21 de la pila fluídica 22. Se entiende fácilmente que una o más de estas etapas pueden ser opcionales, dependiendo de las

circunstancias. Además, también se encuentran dentro del alcance de esta divulgación otras técnicas para montar en la configuración la membrana que contiene un nanoporo.

Opcionalmente, antes de su adaptación, el nanoporo puede ser caracterizado. Para hacerlo, colocar la pila nanoporosa en la configuración experimental 23 blindada eléctricamente y colocar los electrodos 24 en cada reservorio. Esta configuración es similar a la mostrada en la Figura 2 con la excepción de que el circuito amplificador y controlador de corriente es sustituido con un amplificador resistivo de bajo ruido de información de retorno (por ejemplo, un amplificador Axopatch 200B de fijación de tensión de Molecular Devices Inc.). Usando el amplificador en modo de fijación de tensión, aplicar potenciales que realizan un barrido de -200 mV a +200mV y registrar las características de I-V (corriente a tensión). Ajustar la curva I-V para obtener la conductancia del nanoporo, que puede ser usada para calcular su diámetro en solución. Si el diámetro calculado es mucho menor de lo esperado por la formación de imágenes mediante TEM, es probable que el poro no se humecte completamente y/o contenga restos o contaminación. Aplicar un potencial de 200 mV en todo el nanoporo y registrar la corriente iónica durante 30 segundos. Llevar a cabo un análisis de densidad espectral de la potencia (PSD), de la corriente iónica e integrar para cuantificar las características de ruido eléctrico del nanoporo. Si el ruido está por encima de 15 pA RMS con un ancho de banda de 5 kHz, entonces es probable que el poro no esté completamente humectado y/o que contenga contaminación y no pueda ser usado de forma fiable en un experimento.

Si la curva I-V generada presentara asimetría o una conductancia menor de lo esperado, o si la traza de corriente mostrara inestabilidad y niveles de alto ruido a frecuencias bajas (<10 kHz), es necesario acondicionar el nanoporo con campos eléctricos potentes para eliminar cualquier contaminación de la superficie del nanoporo y/o humectar el nanoporo. Aunque este procedimiento no afecta al ruido de alta frecuencia causado por la capacitancia de la membrana o por cualquier capacitancia parásita acoplada a la entrada del amplificador de corriente usado en las mediciones, puede reducirse muchísimo el ruido de baja frecuencia (también denominado ruido *1/f*). Se entiende fácilmente que en algunos casos no se precisa tal acondicionamiento.

La Figura 2 es una configuración ejemplar que puede ser usada para llevar a cabo este acondicionamiento. Para hacerlo, desconectar los electrodos del amplificador de fijación de tensión. Conectar uno de los electrodos a una fuente de alimentación controlada por ordenador capaz de generar más de 3 voltios (fuerza de campo eléctrico > 0,1 V/nm para las membranas de 30 nm de grosor aquí usadas) y el otro al circuito amplificador 25 de corriente que puede ser monitorizado en tiempo real. Aplicar una diferencia de potencial de 400 mV (tensión de medición) en todo el nanoporo durante al menos 5 segundos. Calcular el valor medio de la corriente del 1 segundo final de los datos para determinar la conductancia del nanoporo. Calcular el diámetro del nanoporo en función de esta conductancia, que puede hacerse automáticamente usando un soporte lógico implementado por el controlador 26 y el modelo de elección de conductancia del nanoporo en función de la geometría más probable. Debería corresponder al diámetro medido en la curva I-V. Aplicar un impulso de 200 ms de 6 voltios (tensión de humectación) en todo el nanoporo para producir un campo eléctrico de 0,2 V/nm seguido por un periodo de medición de 5 segundos a 400 mV. Calcular de nuevo el diámetro del nanoporo usando el 1 segundo final de los datos y comparar con el valor previsto a partir de las mediciones TEM para garantizar que el nanoporo está completamente mojado. Alternativamente, en esta etapa se puede realizar un aumento en rampa de la tensión de -200 mV a +200 mV y el ajuste de una curva de I-V según se ha descrito anteriormente para proporcionar una estimación más precisa de la conductancia y, así, del tamaño del nanoporo. Este procedimiento de aplicación de impulsos de campos eléctricos potentes con tensión creciente puede repetirse hasta que la señal de corriente durante el periodo de medición sea estable y muestre la conductancia esperada. No se recomienda superar los 10 voltios (es decir, >0.3 V/nm) en esta etapa, ya que esto puede agrandar o dañar el nanoporo rápida y/o incontrolablemente.

El diámetro del nanoporo es crucial para determinar su funcionalidad para una aplicación particular de detección biomolecular. Con este fin, un nanoporo preformado puede ser agrandado hasta un tamaño deseado aplicando campos eléctricos potentes hasta que se logre el diámetro apropiado con la misma configuración usada para limpiar y humectar el nanoporo (es decir, la Figura 2). Usando la misma configuración, aplicar una polarización de 200-500 mV en todo el poro para obtener la medición del diámetro. Aunque menos preciso que ajustar una curva de I-V, puede usarse una medición de un solo punto para estimar aproximadamente el tamaño de un nanoporo rápidamente.

Se aplica un potencial eléctrico que tiene una forma de onda de impulsos en todo el nanoporo (por ejemplo, un impulso de 2 segundos de 8 voltios en todo el nanoporo seguido por un periodo de medición de aproximadamente 5 segundos a 400 mV). Normalmente, el cálculo del nuevo diámetro mostrará un aumento muy pequeño en el tamaño de un nanoporo (es decir, < 0,1 nm). Repetir este proceso de forma cíclica, alternando entre tensiones de agrandamiento y de medición para obtener mediciones *in situ* y en tiempo real del diámetro creciente del nanoporo. Si resulta deseable una tasa de crecimiento más rápida, la magnitud de la tensión aplicada puede aumentar de forma incremental hasta 10 voltios. Normalmente, el crecimiento se acelerará a medida que se agrande el poro, oscilando la tasa de aumento en la conductancia de 0,03 nSs^{-1} a 10 nSs^{-1}, dependiendo del tamaño del nanoporo, de la fuerza del campo eléctrico y de las propiedades de la solución electrolítica. Por ello, también se puede hacer que varíen la fuerza iónica y el pH de la solución electrolítica para controlar la tasa de crecimiento del nanoporo.

Cuando se alcanza el diámetro deseado, detener la aplicación de campos eléctricos potentes. Esta técnica de adaptación puede ser implementada automáticamente usando un programa informático implementado por el controlador 26. Reconectar el amplificador de fijación de tensión a los electrodos. Obtener nuevos datos de trazas de I-V y de corriente de bajo ruido a 200 mV para confirmar el diámetro del nanoporo y verificar las señales de corriente de bajo ruido como en las etapas destacadas anteriormente. Si es necesario, repetir el protocolo de acondicionamiento y agrandamiento.

La Figura 3A muestra dos trazas típicas de corriente iónica de un nanoporo de 10 nm en una membrana de 30 nm de grosor antes y después del tratamiento con campos eléctricos potentes. Tras montar un nanoporo recién perforado, la probabilidad de obtener una señal de una corriente iónica inestable y ruidosa, que presente un alto grado de fluctuación de baja frecuencia, suele ser alta. El nanoporo mostrado en la Figura 3A destaca este comportamiento. Su conductancia es considerablemente menor de la esperada para un nanoporo de su tamaño, debiéndose con suma probabilidad a una humectación incompleta. Tras la aplicación de campos eléctricos potentes de 0,27 V/nm en magnitud producidos por impulsos de 8 V (90 impulsos de 2 segundos de duración), el nanoporo se humecta por completo. Subsiguientemente es agrandado hasta 21 nm de diámetro. En este punto, el poro presenta una conductancia estable con propiedades de bajo ruido. El análisis cuantitativo del ruido en nanoporos similares es mostrado en la Figura 3B como trazas de densidad espectral de potencia. La amplitud del ruido de baja frecuencia de los poros no mojados y/u obstruidos es muy elevada (>20 pA RMS para un ancho de banda de 5 kHz), lo que los hace inutilizables en el experimento. Tras el acondicionamiento con campos eléctricos potentes, la potencia del ruido a bajas frecuencias (<10 kHz) disminuye en hasta 3 órdenes de magnitud y está lista para experimentos de bajo ruido.

La Figura 4A muestra una medición típica de corriente cuando el potencial aplicado experimenta impulsos entre campos eléctricos potentes para periodos de agrandamiento y de medición con campos eléctricos bajos. En esta realización ejemplar, el potencial se aplicado como una serie de ondas cuadradas. En algunas realizaciones, el potencial eléctrico para un impulso dado puede aumentar o disminuir en rampa (por ejemplo, de forma lineal, exponencial, gradual, etc.) hasta o desde un valor pico. En otras realizaciones, el potencial eléctrico puede variar en el valor pico (por ejemplo, una forma sinusoidal). La presente divulgación contempla otros tipos de formas de onda para aplicar el potencial eléctrico.

Después de cada impulso subsiguiente, la corriente iónica resultante a través del nanoporo a la tensión de medición (es decir, la conductancia del nanoporo) aumenta una cantidad finita. Esto demuestra que el nanoporo ha aumentado de tamaño, ya que el diámetro d puede ser inferido de su conductancia G en una solución de conductividad σ, aproximándose al nanoporo que tiene una geometría cilíndrica de longitud efectiva l_{efe}. Aunque existen diversos modelos adicionales para relacionar la conductancia del nanoporo con su geometría, la siguiente relación ha sido validada para nanoporos perforados mediante TEM, en altas concentraciones salinas, en una amplia gama de diámetros de interés para la translocación biomolecular.

$$G = \sigma\left[\frac{4l_{efe}}{\pi d^2} + \frac{1}{d}\right]^{-1}$$

Una vez que se alcanza el diámetro deseado, el proceso es detenido automáticamente por el soporte lógico. El diámetro del nanoporo resultante puede ser entonces confirmado usando mediciones precisas de I-V, según se muestra en la Figura 5. Es importante hacer notar que los nanoporos tratados usando campos eléctricos potentes son plenamente funcionales.

En un aspecto de esta divulgación, la polaridad del potencial eléctrico puede ser invertida para impulsos alternantes para lograr o mantener la simetría en la geometría del poro. Además, el periodo de medición puede ser extendido o modificado para llevar a cabo una medición de I-V *in situ* para obtener tamaños de nanoporo o propiedades de ruido más precisos.

Diversos factores pueden afectar a la tasa de crecimiento del nanoporo. Por ejemplo, aumentar la magnitud de la tensión aplicada puede incrementar la tasa de crecimiento del nanoporo, según se muestra en la Figura 4B. Variar la fuerza iónica de la solución iónica también puede incrementar la tasa de crecimiento del nanoporo, según se muestra en la Figura 4C. Otros factores que afectan a la tasa de crecimiento incluyen, sin limitación, la temperatura, el pH de la solución iónica, las especies de sal de la solución, etc.

El tratamiento usando campos eléctricos potentes prepara a los nanoporos de estado sólido para experimentos biomoleculares al proporcionar la capacidad de controlar con precisión el tamaño del nanoporo mientras se garantiza un ruido mínimo en las mediciones de la corriente iónica. Este planteamiento es validado, además, llevando a cabo experimentos de translocación biomolecular en ADN λ (bicatenario de 48,5 kbp). Se efectúa un experimento de control adquiriendo trazas de corriente bajo un potencial aplicado de +150 a +300 mV en ausencia de ninguna muestra para verificar que no se detecta ningún bloqueo de corriente después de 2 minutos. Añadir ADN al reservorio *cis* para alcanzar una concentración final de 0,5-5 ng/µL. Someter a reflujo suavemente por pipeta durante al menos 10 segundos para garantizar una distribución homogénea de la muestra en todo el reservorio. Para un nanoporo de 30 nm de grosor, aplicar una polarización de potencial de +150 a +300 mV al reservorio *trans* y medir la

corriente iónica que pasa a través del nanoporo. Para eventos de translocación muy cortos, es deseable tomar muestras a alta frecuencia (250 kHz o mayor) con una frecuencia de filtrado de paso bajo relativamente alta (100 kHz). Monitorizar la corriente iónica usando un soporte lógico para detectar bloqueos transitorios de corriente mientras las moléculas se translocan a través del nanoporo. Las trazas de la corriente iónica de la translocación molecular pueden ser analizadas para determinar la profundidad, la duración y la frecuencia de los bloqueos para inferir información sobre la muestra de interés. En cambio, si se conoce la información sobre las moléculas que se translocan, estos datos pueden ser usados para investigar propiedades del propio nanoporo.

La Figura 6 muestra trazas de corriente asociadas con la translocación de moléculas de ADN λ. En esta figura, se hace pasar ADNbc a través de dos nanoporos que fueron agrandados hasta 11 nm y 32 nm usando el procedimiento descrito anteriormente. En cada caso, la corriente de referencia es sumamente estable y se observan claros bloqueos de corriente cuando las moléculas de ADNbc se translocan a través del nanoporo, presentando eventos de translocación monomoleculares con relación elevada de señal-ruido. Según se muestra en las pautas de la Figura 6, se observan múltiples niveles discontinuos de bloqueo cuando se translocan moléculas individuales plegadas, como se espera para nanoporos de estos tamaños. En las Figuras 7A y 7B se muestran histogramas de la amplitud de los bloqueos de corriente durante eventos de translocación a través de cada poro. Las propiedades de bajo ruido de los nanoporos revelan picos diferenciados fácilmente resolubles correspondientes a la referencia (sin ADN), estados de bloqueo simple (una cadena de ADN, no plegada) y doble (dos cadenas de ADN, plegadas). Cabe hacer notar el hecho de que el bloqueo absoluto de corriente correspondiente a una sola molécula de ADNbc que ocupe el poro es diferente para los nanoporos grandes y los pequeños. Esto proporciona evidencia indirecta de que la aplicación de campos eléctricos potentes agranda, de hecho, los nanoporos existentes, ya que se observaría la misma amplitud de bloqueo de la corriente si durante el proceso se estuvieran creando en la membrana otros poros u otras grietas.

De modo similar, la Figura 8 ilustra la efectividad de los campos eléctricos potentes para agrandar nanoporos fabricados en membranas de diferentes grosores. Aquí se agranda un nanoporo creado en una membrana de SiN_x de 10 nm. Tras la aplicación de impulsos alternantes de ±3 V (±0,3 voltios por nanómetro) de 4 segundos de duración (30 en total), el nanoporo se moja y presenta características ideales de I-V para un poro de 3 nanómetros. A continuación, la metodología se repitió para 400 impulsos subsiguientes y el nanoporo fue agrandado hasta 8 nanómetros. Este agrandamiento, llevado a cabo con campos eléctricos comparables pero menor polarización de la tensión aplicada que para los nanoporos fabricados en membranas de 30 nm, muestra que el proceso funciona, en parte, por los campos eléctricos. Dado que el bloqueo de la corriente producido por la translocación a través de una membrana más delgada es mayor que el producido en poros más gruesos, los nanoporos en membranas delgadas tratados de esta manera pueden ser usados para estudiar con mayor sensibilidad moléculas más cortas, tales como proteínas.

El control de tamaño de un nanoporo es de importancia fundamental en aplicaciones de detección biomolecular. Los diámetros de los nanoporos deben ser del orden del tamaño de las moléculas objeto de sondeo; deben ser lo bastante grandes para acomodar la muestra, pero lo bastante pequeños para lograr una relación señal-ruido óptima. aunque el control de tamaño usando el procedimiento presentado de aplicación de campos eléctricos potentes es unidireccional, porque los diámetros de los nanoporos solo son *aumentados* en el proceso, pueden crearse nanoporos con diámetros entre 3-100 nm con precisión subnanométrica. Dado que poros de 3-4 nm pueden ser fabricados fácilmente usando TEM u otros procedimientos, esto permite la fabricación fiable de nanoporos de estado sólido para una amplia gama de aplicaciones, desde el sondeo de una estructura de ADNmc hasta la interacción de complejos voluminosos de proteína-ligando. Aunque el crecimiento de nanoporos por encima de 100 nm puede ser más rápido y menos preciso, pueden emplearse condiciones de agrandamiento más moderadas para lograr un mejor control en el proceso. Como tal, la etapa más importante para lograr un control efectivo del tamaño es la elección de la intensidad y la duración de los impulsos para equilibrar la eficacia del agrandamiento y el nivel de precisión requerido para lograr un diámetro deseado de poro. Dependiendo del tamaño final, generalmente es posible agrandar un nanoporo hasta diámetros inferiores a 100 nm en unos minutos.

De modo similar, las grandes fluctuaciones de corrientes de baja frecuencia excluyen los estudios monomoleculares, ya que es casi imposible diferenciar las señales de translocación del ruido de fondo. La humectación incompleta, la presencia de residuos carbonáceos que queden tras la fabricación inicial y la adsorción de restos en la pared del nanoporo pueden degradar la calidad de las señales, requiriendo una limpieza adicional con tratamientos químicos fuertes que a menudo son ineficaces. Curiosamente, es común que los protocolos de nanoporos de estado sólido recalquen la importancia de limpiar el nanoporo antes del montaje para contribuir a la humectación, y la solución sugerida para los intentos fallidos es llevar a cabo una limpieza adicional con solución piraña o plasma, lo que puede llevar muchísimo tiempo. Con la aplicación de campos eléctricos potentes, estos prolongados protocolos pueden no ser necesarios, dependiendo del experimento que haya de llevarse a cabo, y la etapa más importante para mitigar el ruido eléctrico es un simple aumento en la tensión y/o la duración de los impulsos para mojar completamente el poro y eliminar los restos sueltos. Los nanoporos tratados de esta manera pueden ser usados de forma fiable en experimentos de translocación de biomoléculas, tales como el paso de ADN y proteínas. Si estas moléculas se adhieren a la pared del poro, llevando a una señal eléctrica obstruida y ruidosa, pueden volver a aplicarse impulsos de campos eléctricos potentes para eliminar la obstrucción y recuperar las propiedades de bajo ruido para la experimentación ulterior, sin desmontar el chip del nanoporo de la pila fluídica.

La aplicación de campos eléctricos potentes usando la configuración descrita está actualmente limitada por el requisito de una fuente de alimentación externa que pueda aplicar hasta 10 V y de un amplificador de corriente, que carecen de la sensibilidad y de las propiedades de bajo ruido con un ancho de banda elevado (>1kHz) para la detección de una sola molécula. Aunque los experimentos biomoleculares normales se valen de un amplificador de corriente de bajo ruido que está limitado a ±1 V (tal como el Axopatch 200B), es sencillo diseñar un solo sistema que pudiera lograr tanto un acondicionamiento de campos eléctricos potentes como una medición sensible de corriente con una ganancia ajustable. A pesar de esta limitación, la transición de una configuración a la otra es rápida y sencilla. En comparación con las técnicas existentes para controlar el tamaño de un nanoporo, tales como el uso de SEM, oxidación térmica y reformación de la membrana, los campos eléctricos potentes ofrecen una metodología más rápida, más precisa y menos costosa que puede ser llevada a cabo en el banco de laboratorio usando equipo estándar y proporcionar un intervalo más amplio de tamaños de nanoporo. Además, el procedimiento se lleva a cabo *in situ* en condiciones experimentales, mejorando la fiabilidad y la precisión del control del tamaño de un nanoporo. Además, la capacidad de reducir de forma rápida y reproducible el ruido de baja frecuencia y de agrandar subsiguientemente un nanoporo hasta un tamaño deseado, también hacen más fiable la preparación de nanoporos y prolongan la vida de los nanoporos de estado sólido, ya que los poros usados previamente pueden ser rejuvenecidos y reacondicionados para experimentos ulteriores. Más del 95% de los nanoporos de distintos grosores acondicionados con campos eléctricos potentes en el laboratorio de los inventores presentó muy poca característica de ruido de baja frecuencia, haciéndolos adecuados para la detección biomolecular. Estos procedimientos permiten que los experimentos sean más accesibles para los investigadores y potencialmente permiten una vía hacia la comercialización de tecnologías de nanoporo a través de procesos de fabricación más robustos.

Las técnicas descritas en la presente memoria pueden ser implementadas por medio de uno o más programas informáticos ejecutados por uno o más procesadores. Los programas informáticos incluyen instrucciones ejecutables por procesador que están almacenadas en un soporte tangible no transitorio legible por ordenador. Los programas informáticos también pueden incluir datos almacenados. Ejemplos no limitantes del soporte tangible no transitorio legible por ordenador son la memoria no volátil, el almacenamiento magnético y el almacenamiento óptico.

Algunas porciones de la anterior descripción presentan las técnicas descritas en la presente memoria en términos de algoritmos y representaciones simbólicas de operaciones sobre información. Estas descripciones algorítmicas y estas representaciones son los medios usados por los expertos en las técnicas de procesamiento de datos para transmitir con la máxima efectividad la sustancia de su trabajo a otros expertos en la técnica. Se entiende que estas operaciones, aunque descritas funcional o lógicamente, son implementadas por programas informáticos. Además, también ha resultado conveniente en ocasiones referirse a estas disposiciones de operaciones como módulos o mediante nombres funcionales, sin pérdida de generalidad.

A no ser que se afirme específicamente algo distinto, como es evidente por la anterior exposición, se aprecia que en toda la descripción, las explicaciones que utilicen términos tales como “procesamiento” o “cálculo” o “calcular” o “determinar” o “mostrar” o similares, se refieren a la acción y los procesos de un sistema informático o un dispositivo de cálculo electrónico similar, que manipule y transforme los datos representados como cantidades físicas (electrónicas) dentro de las memorias y los registros de un sistema informático, u otros dispositivos de almacenamiento, transmisión o visualización de información de ese tipo.

Ciertos aspectos de las técnicas descritas incluyen etapas de procedimientos e instrucciones descritas en la presente memoria en la forma de un algoritmo. Debería hacerse notar que las etapas y las instrucciones de procedimiento descritas podrían ser implementadas en soporte lógico, en soporte lógico inalterable o en soporte físico, y que, cuando están implementadas en soporte lógico, podrían ser descargadas para que residieran en diferentes plataformas usadas por sistemas operativos de red en tiempo real y fueran operadas desde las mismas.

La presente divulgación también versa sobre un aparato para llevar a cabo las operaciones de la presente memoria. Este aparato puede ser construido especialmente para los fines requeridos, o puede comprender un ordenador de uso general activado selectivamente o reconfigurado por un programa informático almacenado en un soporte legible por ordenador al que el ordenador puede acceder. Tal programa informático puede ser almacenado en un soporte tangible de almacenamiento legible por ordenador, tal como, sin limitación, cualquier tipo de disco, incluyendo disquetes, discos ópticos, CD-ROM, discos magneto-ópticos, memorias de solo lectura (ROM), memorias de acceso aleatorio (RAM), EPROM, EEPROM, tarjetas magnéticas u ópticas, circuitos integrados para aplicaciones específicas (ASIC) o cualquier tipo de soporte adecuado para almacenar instrucciones electrónicas, y cada uno acoplado a un bus de un sistema informático. Además, los ordenadores a los que se alude en la memoria pueden incluir un solo procesador o tener arquitecturas que empleen diseños de procesadores múltiples para una mayor capacidad de cálculo.

La anterior descripción de las realizaciones ha sido proporcionada con fines de ilustración y de descripción. No se pretende que sea exhaustiva ni que limite la divulgación. Los elementos o características individuales de una realización particular generalmente no están limitados a esa realización particular, sino que, cuando sean aplicables, son intercambiables y pueden ser usados en una realización seleccionada, aunque no sean mostrados o descritos específicamente. Los mismos también pueden ser variados de muchas maneras. No se ha de considerar que tales

variaciones sean un alejamiento de la divulgación, y se pretende que todas las modificaciones de ese tipo estén incluidas dentro del alcance de la divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar de manera precisa el tamaño de un nanoporo formado en una membrana, que comprende:

a) seleccionar un valor para un potencial eléctrico que induce un campo eléctrico en un nanoporo, siendo el campo eléctrico de más de 0,1 voltios por nanómetro;

b) aplicar, durante un periodo de tiempo predeterminado, un potencial eléctrico del valor seleccionado, en todo el nanoporo dispuesto en una solución iónica, aplicando, por ello, un potencial elevado de agrandamiento;

c) después del periodo de tiempo predeterminado, reducir el potencial eléctrico aplicado en todo el nanoporo hasta un valor menor que el valor seleccionado, aplicando, por ello, un potencial bajo de medición, siendo el potencial bajo de medición menor que el potencial elevado de agrandamiento;

d) medir la corriente que fluye a través del nanoporo mientras se aplica el potencial eléctrico al valor reducido; y

e) determinar el tamaño del nanoporo en función de la corriente medida.

2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la determinación del tamaño del nanoporo comprende, además, eliminar el potencial eléctrico aplicado en todo el nanoporo cuando la corriente medida es igual o mayor que una corriente umbral seleccionada para que se corresponda con un tamaño deseado de nanoporo.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 que, además, comprende:

f) aumentar el potencial eléctrico aplicado en todo el nanoporo hasta el valor seleccionado cuando la corriente medida es menor que una corriente umbral seleccionada para que se corresponda con un tamaño deseado de nanoporo, y

g) repetir las etapas (b) - (f) hasta que la corriente medida sea igual o mayor que el umbral.

4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la selección del valor para el potencial eléctrico comprende, además, seleccionar el valor del potencial eléctrico de modo que el campo eléctrico sea aproximadamente 0,3 voltios por nanómetro.

5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la selección del valor para el potencial eléctrico comprende, además, seleccionar el valor del potencial eléctrico de modo que el campo eléctrico se encuentre en un intervalo de 0,10 voltios por nanómetro a 0,4 voltios por nanómetro.

6. El procedimiento de la reivindicación 1 que, además, comprende aplicar el potencial eléctrico al valor reducido durante un periodo de tiempo que permite que la corriente iónica óhmica se estabilice.

7. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que la determinación del tamaño del nanoporo comprende, además, reaplicar el potencial eléctrico del valor seleccionado en todo el nanoporo cuando la corriente medida es menor que la corriente umbral, en la que la polaridad del potencial eléctrico se invierte.

8. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la aplicación del potencial eléctrico comprende, además, aumentar el valor del potencial elevado de agrandamiento para aumentar la tasa de crecimiento del nanoporo.

9. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la aplicación del potencial eléctrico comprende, además, aumentar la fuerza iónica de la solución iónica para aumentar la tasa de crecimiento del nanoporo.

10. El procedimiento de la reivindicación 1 que, además, comprende aplicar el potencial eléctrico como una forma de onda de impulsos que oscila entre el potencial elevado de agrandamiento y el potencial bajo de medición, produciéndose la medición de la corriente que fluye a través del nanoporo mientras se está aplicando el potencial bajo de medición.

11. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que la aplicación del potencial eléctrico comprende, además, alternar la polaridad del potencial eléctrico entre un valor positivo y un valor negativo por cada dos impulsos.

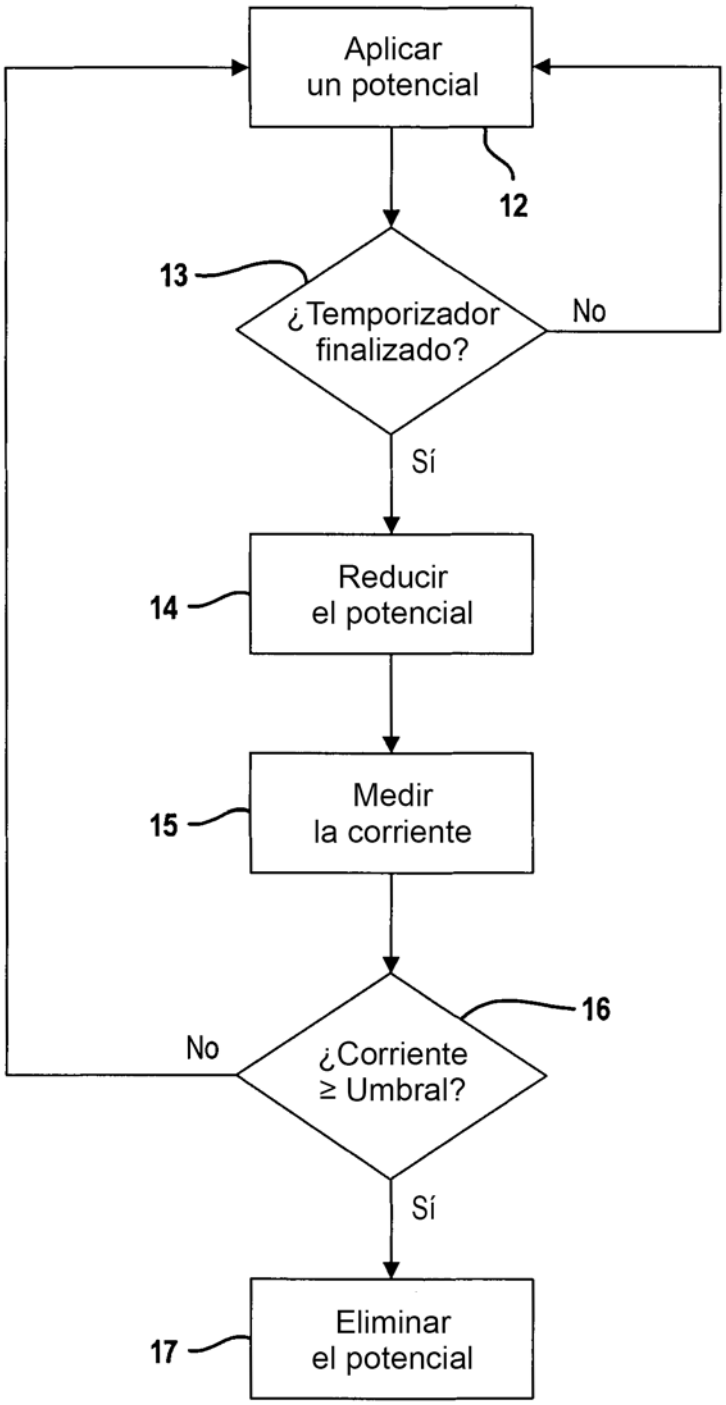

Aplicar
un potencial
12
13
¿Temporizador
finalizado?
No
Sí
14
Reducir
el potencial
15
Medir
la corriente
16
No
¿Corriente
≥ Umbral?
Sí
17
Eliminar
el potencial

FIG. 1

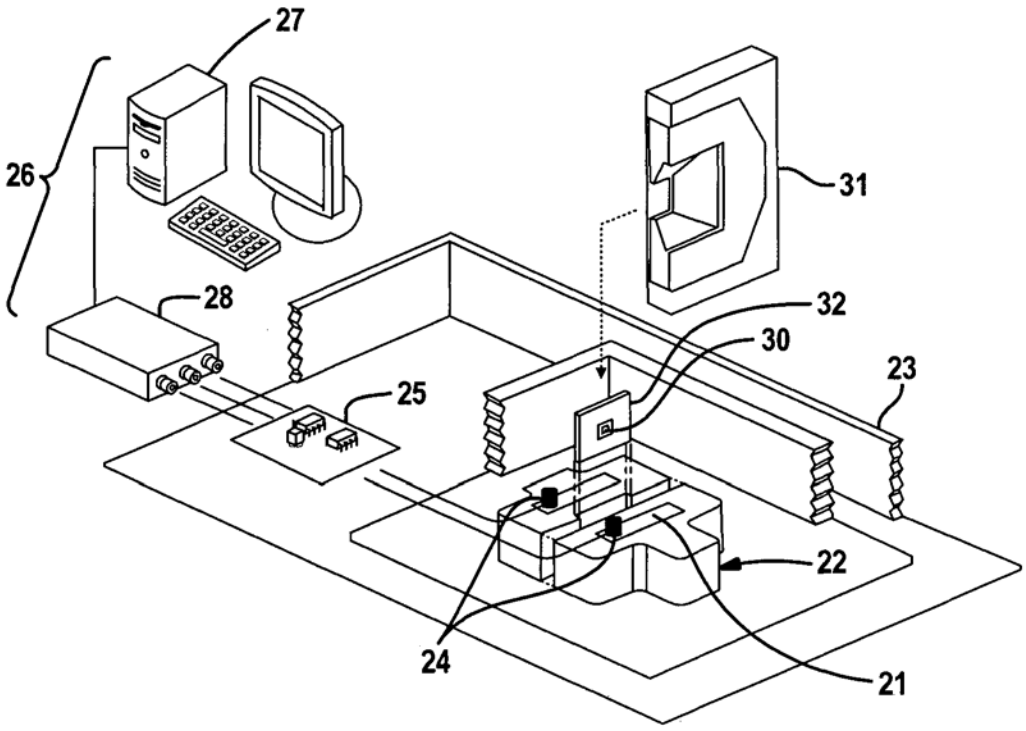
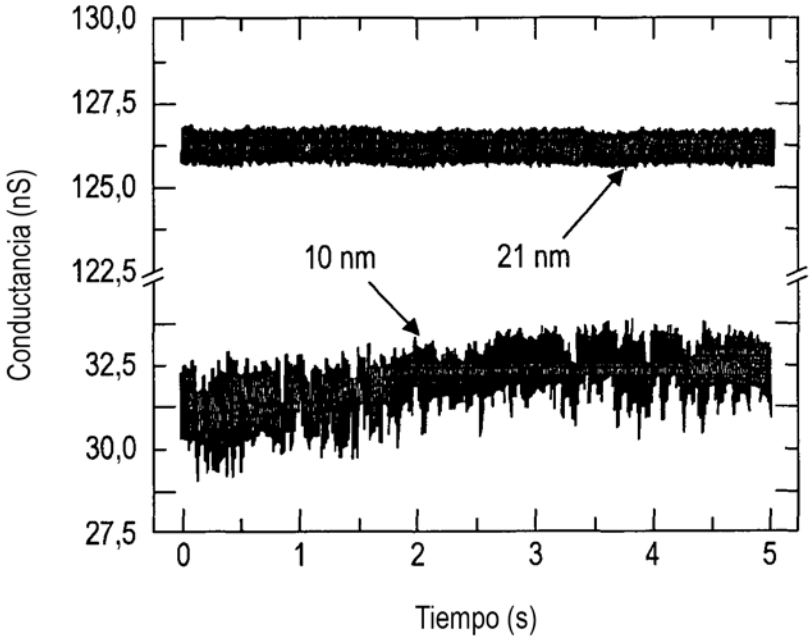


FIG. 2

FIG. 3A


130,0
127,5
125,0
122,5
32,5
30,0
27,5
Conductancia (nS)
10 nm
21 nm
0
1
2
3
4
5
Tiempo (s)

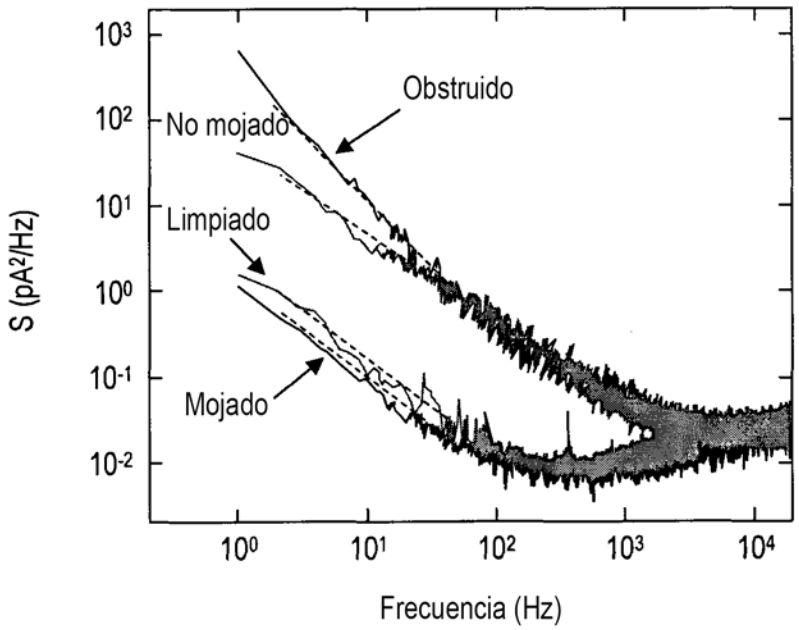

10^3
10^2
10^1
10^0
10^{-1}
10^{-2}
S (pA²/Hz)
Obstruido
No mojado
Limpiado
Mojado
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Frecuencia (Hz)

FIG. 3B

FIG. 4A

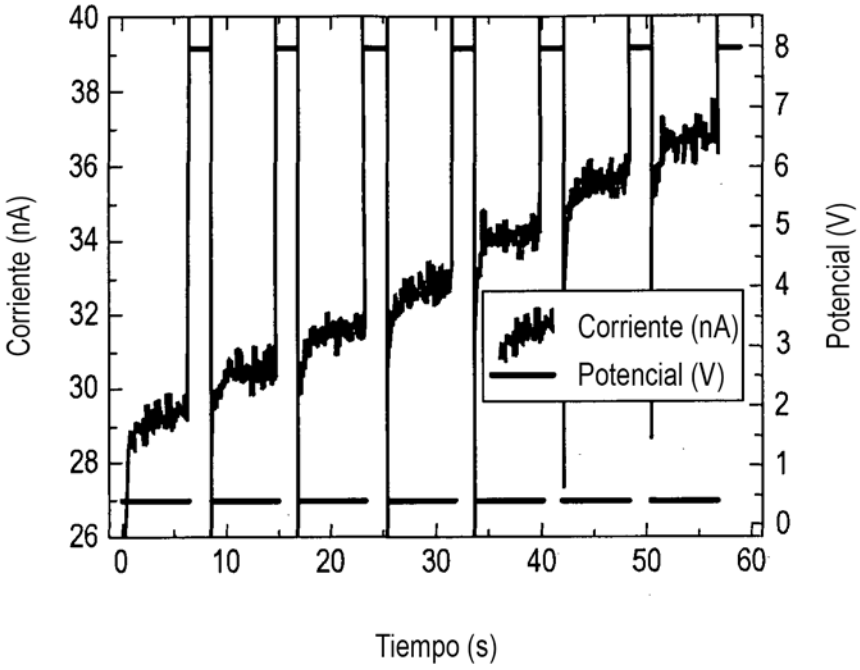

Corriente (nA)
Potencial (V)
Tiempo (s)
Corriente (nA)
Potencial (V)

FIG. 4B

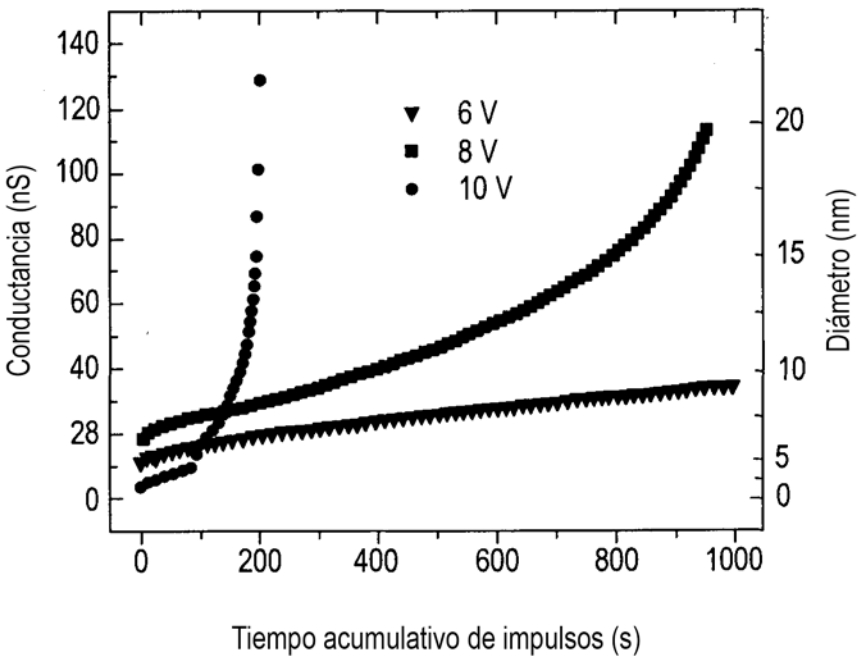
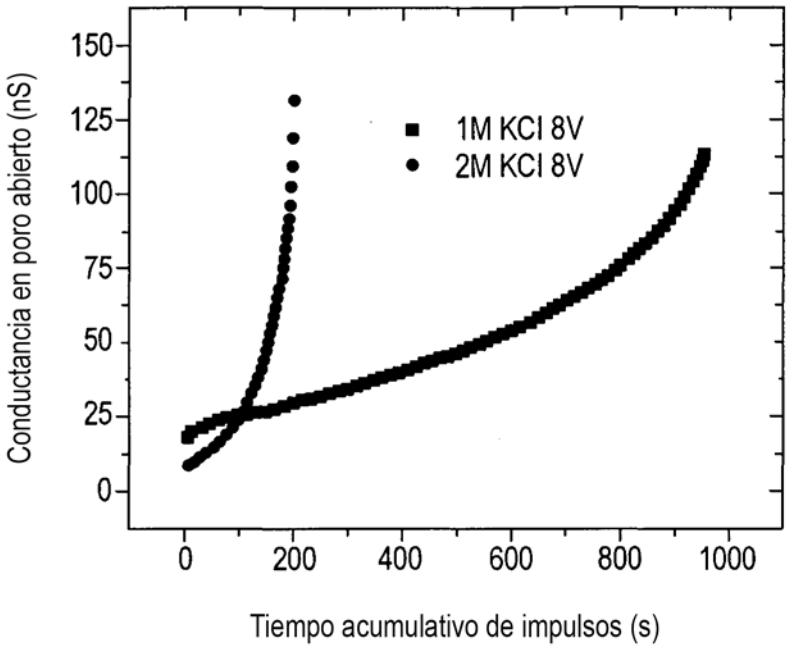

Conductancia (nS)
Diámetro (nm)
Tiempo acumulativo de impulsos (s)
6 V
8 V
10 V

FIG. 4C


Conductancia en poro abierto (nS)
150
125
100
75
50
25
0
1M KCl 8V
2M KCl 8V
0
200
400
600
800
1000
Tiempo acumulativo de impulsos (s)

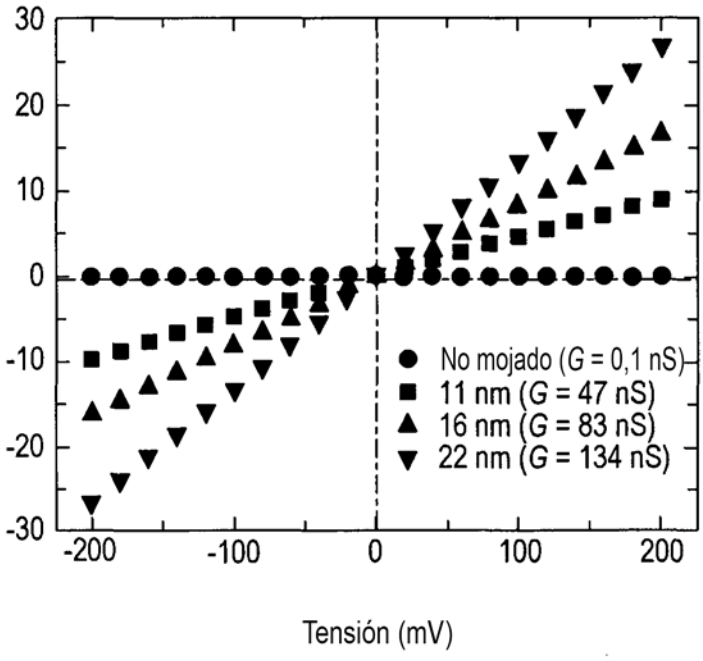

30
20
10
0
-10
-20
-30
-200
-100
0
100
200
No mojado (G = 0,1 nS)
11 nm (G = 47 nS)
16 nm (G = 83 nS)
22 nm (G = 134 nS)
Tensión (mV)

FIG. 5

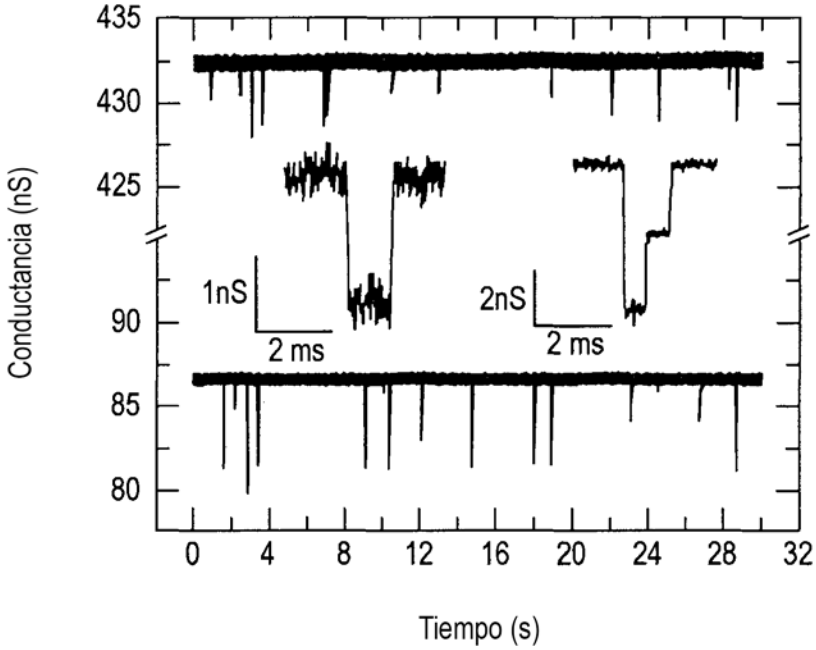


FIG. 6

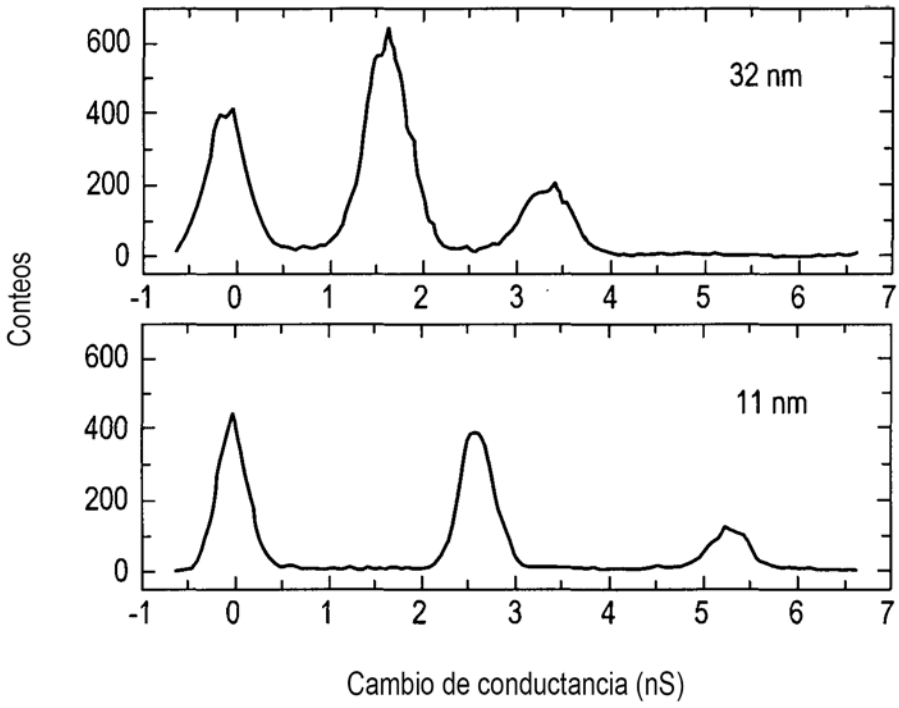


FIG. 7A

FIG. 7B

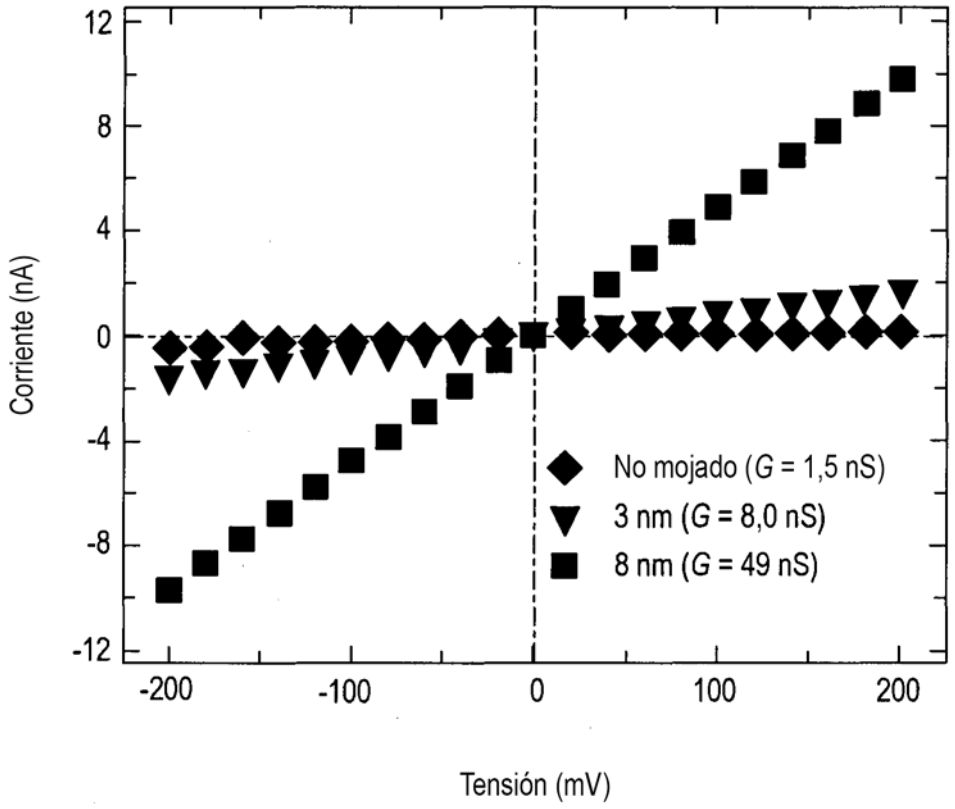

12
8
4
0
-4
-8
-12
-200
-100
0
100
200
Corriente (nA)
Tensión (mV)
No mojado (G = 1,5 nS)
3 nm (G = 8,0 nS)
8 nm (G = 49 nS)

FIG. 8