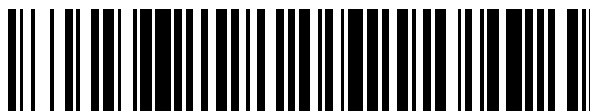


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 256**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6869 (2008.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2013 PCT/US2013/026514**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123450**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2013 E 13748712 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2814983**

54 Título: **Procedimientos para crear bicapas para su uso con sensores con nanoporos**

30 Prioridad:

16.02.2012 US 201261599871 P

17.02.2012 US 201261600398 P

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

21.11.2019

73 Titular/es:

GENIA TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)

2841 Scott Blvd.

Santa Clara CA 95050, US

72 Inventor/es:

DAVIS, RANDALL y

CHEN, ROGER

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 732 256 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

Procedimientos para crear bicapas para su uso con sensores con nanoporos

5 **Antecedentes**

La secuenciación de ácidos nucleicos es un procedimiento que se puede usar para proporcionar información de la secuencia de una muestra de ácido nucleico. Dicha información de la secuencia puede ser útil para diagnosticar y/o tratar a un sujeto. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de un sujeto se puede usar para identificar, diagnosticar y potencialmente desarrollar tratamientos para enfermedades genéticas. Como otro ejemplo, la investigación de patógenos puede conducir al tratamiento de enfermedades contagiosas. La detección molecular (por ejemplo, de proteínas) también puede ser útil para diagnosticar y/o tratar a un sujeto.

Hay procedimientos disponibles que se pueden usar para secuenciar un ácido nucleico y/o detectar moléculas. Sin embargo, dichos procedimientos son costosos y pueden no proporcionar información de la secuencia en un plazo y con una exactitud que pueden ser necesarios para diagnosticar y/o tratar a un sujeto.

El documento WO2011097028 describe sistemas y procedimientos para manipular una molécula en un nanoporo. El documento WO2007047498 describe composiciones, procedimientos y dispositivos relacionados con membranas de bicapa y monocapa, su encapsulación en un hidrogel y su formación. El documento WO2009077734 describe la formación de capas de moléculas anfipáticas. El documento JP2006312141 describe un procedimiento para formar una doble membrana lipídica y su aparato. El documento EP2219032 describe una matriz de bicapa lipídica plana formada usando microfluidos y un procedimiento de análisis que usa las bicapas lipídicas planas.

25 **Sumario**

Los nanoporos se pueden usar para secuenciar polímeros que incluyen moléculas de ácido nucleico y/o detectar moléculas tales como las proteínas. Los ejemplos de polímeros incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). En el presente documento se reconoce la necesidad de procedimientos mejorados para la identificación de moléculas de ácido nucleico, la secuenciación de ácidos nucleicos y la detección molecular. En el presente documento se describen procedimientos para formar una bicapa lipídica (también llamada "bicapa" en el presente documento) e insertar un nanoporo en la bicapa cerca de un sensor.

En algunos casos, el polímero (por ejemplo, ácido nucleico) se pasa a través del nanoporo y diversas subunidades del polímero (por ejemplo, las bases de ácido nucleico adenina [A], citosina [C], guanina [G], timina [T] y/o uracilo [U]) pueden afectar a la corriente que fluye a través del nanoporo. Como se describe en el presente documento, las diversas subunidades se pueden identificar midiendo la corriente en una pluralidad de tensiones aplicadas a través del nanoporo y/o membrana.

La invención proporciona un procedimiento para formar una bicapa lipídica para su uso en un sensor con nanoporos que comprende (a) dirigir una solución amortiguadora en un canal de flujo que comprende un electrodo que tiene una capa de material sobre el mismo, en el que la solución amortiguadora es eléctricamente conductora, y en el que la capa de material comprende uno o más lípidos; (b) poner la solución amortiguadora en contacto con la capa de material; (c) medir una corriente a través del electrodo para determinar si al menos una parte de la capa de material ha formado una bicapa lipídica contigua al electrodo; y (d) basándose en la determinación de (c), aplicar un estímulo al electrodo para inducir que al menos la parte de la capa de material forme dicha bicapa lipídica contigua al electrodo.

En algunos modos de realización, se aplican una o más tensiones a los electrodos en (c).

50 En algunos modos de realización, la tensión es lo suficientemente alta como para romper la bicapa sobre el electrodo.

En algunos modos de realización, el estímulo se aplica simultáneamente a todos los electrodos.

55 En algunos modos de realización, el estímulo comprende al menos uno de un flujo de líquido sobre la superficie del electrodo, un flujo secuencial de uno o más líquidos diferentes sobre la superficie del electrodo, el flujo de una o más burbujas sobre la superficie del electrodo, un impulso eléctrico, impulso ultrasónico, impulso compresivo o impulso sónico.

60 En algunos modos de realización, la capa de material que comprende una o más proteínas porínicas comprende uno o más tensioactivos a una concentración inferior a la concentración micelar crítica del tensioactivo.

En algunos modos de realización, el canal de flujo comprende una pluralidad de electrodos.

65 En algunos modos de realización, la capa de material comprende un lípido. En algunos casos, la capa de material comprende al menos dos, tres, cuatro, cinco o diez tipos de lípidos.

- En algunos modos de realización, la capa de material comprende una proteína del poro.
- En algunos modos de realización, la proteína del poro es porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA), hemolisina α , cualquier proteína que tenga al menos un 70 % de homología con al menos una de porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA) o hemolisina α , o cualquier combinación de las mismas.
- En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además, después de (d), aplicar un estímulo eléctrico a través del electrodo para facilitar la inserción de la proteína del poro en la membrana (por ejemplo, en la bicapa lipídica).
- En algunos modos de realización, la membrana y la proteína del poro presentan juntas una resistencia de aproximadamente 1 G Ω o menos.
- En algunos modos de realización, la membrana sin una proteína del poro presenta una resistencia mayor que aproximadamente 1 G Ω .
- En algunos modos de realización se selecciona una presión de la solución amortiguadora de modo que la capa de material forme la membrana sin el estímulo.
- En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además, antes de (a), generar la capa de material contigua al electrodo.
- En algunos modos de realización, la operación de generación comprende: dirigir una solución lipídica que comprende uno o más lípidos a través del canal de flujo; y depositar la capa de material sobre el electrodo.
- En algunos modos de realización, la solución lipídica comprende un disolvente orgánico.
- En algunos modos de realización, el disolvente orgánico comprende decano.
- En algunos modos de realización, la solución amortiguadora comprende una solución iónica.
- En algunos modos de realización, la solución iónica comprende un anión cloruro.
- En algunos modos de realización, la solución iónica comprende acetato de sodio.
- En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además, después de (a): dirigir una burbuja a través del canal de flujo; y poner la burbuja en contacto con la capa de material para suavizar y/o diluir la capa de material.
- En algunos modos de realización, la burbuja es una burbuja de vapor.
- En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además: hacer fluir una solución de proteína del poro contigua a la capa de material para depositar una proteína del poro en la capa de material; y diluir la capa de material con solución iónica y/u otra burbuja en el canal de flujo.
- En algunos modos de realización, los lípidos se pueden seleccionar del grupo que consiste en difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), dioleoilfosfatidilmetiléster (DOPME), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y esfingomielina.
- En algunos modos de realización, una superficie del electrodo que está expuesta al canal de flujo es hidrófila.
- En algunos modos de realización, el electrodo está dispuesto contiguo a una o más superficies hidrófobas del canal de flujo.
- En algunos modos de realización, la una o más superficies hidrófobas están silanizadas.
- En algunos modos de realización, el canal de flujo se forma en un chip.
- En algunos modos de realización, el electrodo se forma en una superficie del canal de flujo.
- En algunos modos de realización, el canal de flujo está sellado.
- En algunos modos de realización, el uno o más canales de flujo comprenden una pluralidad de canales de flujo.
- En algunos modos de realización, la pluralidad de canales de flujo están separados hidráulicamente entre sí con la ayuda de carriles de guía a lo largo de la pluralidad de canales de flujo.

En algunos modos de realización, el electrodo es un electrodo direccionable individualmente.

5 Se describe un procedimiento para formar una membrana (por ejemplo, una bicapa lipídica) para su uso en un dispositivo de detección con nanoporos que comprende: (a) proporcionar un chip que comprende una pluralidad de electrodos y capas de material contiguas a la pluralidad de electrodos, en el que cada una de las capas de material comprende uno o más componentes (por ejemplo, lípidos) de las membranas; (b) poner en contacto las capas de material con una solución amortiguadora, en la que la solución amortiguadora es eléctricamente conductora; (c) aplicar un estímulo al menos a un subconjunto de la pluralidad de electrodos para inducir que las capas de material formen
10 membranas contiguas a la pluralidad de electrodos; y (d) repetir las etapas (b) y (c), según sea necesario, hasta que al menos aproximadamente el 20 % de la pluralidad de electrodos se desactive con un impulso de tensión entre aproximadamente -100 milivoltios (mV) y -1000 mV aplicado a la pluralidad de electrodos.

15 La pluralidad de electrodos pueden ser cada uno direccionable individualmente.

Las etapas (b) y (c) se pueden repetir según sea necesario hasta que al menos aproximadamente el 60 % de la pluralidad de electrodos se desactive con el impulso de tensión aplicado.

20 El impulso de tensión aplicado puede estar entre aproximadamente -400 mV y -700 mV.

El estímulo puede comprender al menos uno de un flujo de líquido sobre la superficie del electrodo, un flujo secuencial de uno o más líquidos diferentes sobre la superficie del electrodo, el flujo de una o más burbujas sobre la superficie del electrodo, un impulso eléctrico, impulso ultrasónico, impulso compresivo o impulso sónico.

25 Cada una de las capas de material puede comprender una proteína del poro.

La proteína del poro puede ser porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA), hemolisina α , cualquier proteína que tenga al menos un 70 % de homología con al menos una de porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA) o hemolisina α , o cualquier combinación de las mismas.

30 El procedimiento puede comprender además, después de (c), aplicar un estímulo eléctrico a través de al menos un subconjunto de los electrodos para facilitar la inserción de la proteína del poro en cada una de las bicapas lipídicas.

35 El procedimiento puede comprender además: poner en contacto la pluralidad de electrodos con una solución lipídica para formar las capas de material, en el que la solución lipídica comprende el lípido.

La solución lipídica puede comprender un disolvente orgánico.

40 El disolvente orgánico puede comprender decano.

La solución amortiguadora puede comprender una solución iónica.

La solución iónica puede comprender un anión cloruro.

45 La solución iónica puede comprender acetato de sodio.

El procedimiento puede comprender además, entre las etapas (a) y (b), dirigir una burbuja contigua a cada una de las capas de material.

50 Los electrodos pueden estar sellados en uno o más canales de flujo del chip.

Se describe un procedimiento para detectar una molécula diana que comprende: (a) proporcionar un chip que comprende un nanoporo en una membrana que está dispuesta contigua o cerca de un electrodo de detección; (b) dirigir una molécula de ácido nucleico a través del nanoporo, en la que la molécula de ácido nucleico está asociada con una molécula indicadora, en la que la molécula de ácido nucleico comprende una región de dirección y una región de sonda, en la que la molécula indicadora está asociada con la molécula de ácido nucleico en la región de sonda, y en la que la molécula indicadora está acoplada a una molécula diana; (c) secuenciar la región de dirección mientras la molécula de ácido nucleico se dirige a través del nanoporo para determinar una secuencia de ácido nucleico de la región de dirección; y (d) identificar, con la ayuda de un procesador informático, la molécula diana basándose en una
60 secuencia de ácido nucleico de la región de dirección determinada en (c).

En (b), la sonda molecular en (b) se puede mantener en el poro mediante la unión de una molécula indicadora a la región de sonda de la molécula de ácido nucleico.

65 Se pueden identificar hasta tres bases de la molécula de ácido nucleico cuando se reduce la velocidad de progresión de la molécula de ácido nucleico a través del nanoporo.

Se pueden identificar hasta cinco bases de la molécula de ácido nucleico cuando se reduce la velocidad de progresión de la molécula de ácido nucleico a través del nanoporo.

5 La velocidad de progresión de la molécula de ácido nucleico a través del nanoporo se puede reducir mediante la interacción de la molécula indicadora con el nanoporo.

En (b), una velocidad de progresión de la molécula de ácido nucleico a través del nanoporo se puede detener o estancar.

10 El procedimiento descrito puede comprender además, antes de (d), determinar si se ha reducido una velocidad de progresión de la molécula nucleica a través del nanoporo.

15 En (d), la molécula diana se puede identificar si se determina que la velocidad de progresión de la molécula de ácido nucleico a través del nanoporo se ha reducido.

En (d), la molécula diana se puede identificar basándose en una correlación entre (i) una secuencia de ácido nucleico de la región de dirección y una asociación y (ii) una velocidad de progresión de la molécula de ácido nucleico a través del nanoporo.

20 El nanoporo puede ser direccionable individualmente.

La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria.

25 El procedimiento puede comprender además retener la molécula de ácido nucleico en el nanoporo.

La molécula de ácido nucleico se puede retener en el nanoporo con la ayuda de estructuras voluminosas formadas en una o más partes finales de la molécula de ácido nucleico.

30 La molécula de ácido nucleico se puede retener en el nanoporo con la ayuda de estructuras voluminosas fijadas a una o más partes finales de la molécula de ácido nucleico.

El procedimiento puede comprender además invertir una dirección de flujo de la molécula de ácido nucleico a través del nanoporo.

35 El procedimiento puede comprender además la resecuenciación de al menos una parte de la región de dirección al invertir la dirección de flujo de la molécula de ácido nucleico.

40 La molécula indicadora puede comprender un anticuerpo o aptámero en una parte final de la molécula indicadora, y en la que el anticuerpo o aptámero está asociado con la molécula diana.

La región de dirección y la región de sonda pueden tener secuencias de ácido nucleico conocidas.

45 La molécula indicadora puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la región de sonda.

La molécula de ácido nucleico se puede asociar con la molécula indicadora antes de dirigirse a través.

50 Antes de (b), la molécula de ácido nucleico se puede introducir a través del nanoporo, y en el que, en (b), la molécula indicadora se asocia con la molécula de ácido nucleico que se ha introducido a través del nanoporo.

55 Los aspectos y ventajas adicionales de la presente divulgación quedarán fácilmente evidentes para los expertos en esta técnica a partir de la siguiente descripción detallada, en la que solo se muestran y describen modos de realización ilustrativos de la presente divulgación. Como se comprenderá, la presente divulgación permite otros modos de realización diferentes, y sus diversos detalles se pueden modificar en diversos aspectos obvios, todos sin apartarse de la divulgación.

En consecuencia, los dibujos y la descripción se deben considerar de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

60 **Breve descripción de los dibujos**

65 Los rasgos característicos novedosos de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de los rasgos característicos y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que presenta modos de realización ilustrativos, en los que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos (también "figura" y "FIG." en el presente documento) de los que:

- Las **figuras 1A, 1B y 1C** muestran ejemplos de detectores de nanoporo. En la **figura 1A**, el nanoporo está dispuesto sobre el electrodo; en la **figura 1B**, el nanoporo se inserta en una membrana sobre un pocillo; y en la **figura 1C**, el nanoporo está dispuesto sobre un electrodo saliente;
- 5 Las **figuras 2A, 2B, 2C y 2D** muestran ejemplos de moléculas que se pueden detectar con nanoporos. La **figura 2A** muestra la detección de una molécula; la **figura 2B** muestra la detección de partes de una molécula de polímero; la **figura 2C** muestra la detección de moléculas marcadoras para la secuenciación de ácidos nucleicos; y la **figura 2D** muestra la detección de la marca mientras se incorpora el nucleótido;
- 10 La **figura 3** muestra un ejemplo de una configuración de chip que comprende un nanoporo y no un pocillo;
- La **figura 4** muestra un ejemplo de un circuito de medición ultracompacto;
- La **figura 5** muestra una matriz de detectores de nanoporo;
- 15 La **figura 6** muestra un sistema informático configurado para controlar un secuenciador;
- La **figura 7** muestra un ejemplo de un procedimiento para formar una capa lipídica sobre los electrodos en uno o más canales de flujo del chip sensor;
- 20 La **figura 8** muestra un ejemplo de un chip sensor semiconductor;
- La **figura 9** ilustra un ejemplo de una sonda molecular retenida en un nanoporo;
- 25 La **figura 10** ilustra una sonda molecular de ejemplo retenida en un nanoporo;
- La **figura 11** ilustra una secuencia lineal de ejemplo de una sonda molecular;
- La **figura 12** ilustra una hebra de antisentido que se puede unir para formar una caperuza bicatenaria que es lo suficientemente voluminosa como para que se excluya del nanoporo;
- 30 La **figura 13** ilustra un flujo del procedimiento para retener y caracterizar una sonda molecular utilizando un nanoporo;
- La **figura 14** es un flujo del procedimiento para capturar e identificar, contar, clasificar y/o recoger moléculas diana utilizando una sonda retenida en un nanoporo;
- 35 La **figura 15** es un flujo del procedimiento para contar, agrupar y recoger la molécula diana utilizando una sonda molecular retenida en un nanoporo;
- La **figura 16** es un flujo del procedimiento para detectar, identificar, contar, agrupar y/o recoger moléculas de proteína diana utilizando una sonda molecular retenida en un nanoporo;
- 40 La **figura 17** es un flujo del procedimiento para detectar, identificar, contar, agrupar y/o recoger moléculas de proteína diana utilizando una sonda molecular retenida en un nanoporo;
- 45 La **figura 18** ilustra la estructura de una molécula de proteína unida a un anticuerpo marcado con indicador;
- La **figura 19** es un flujo del procedimiento para caracterizar la molécula diana (por ejemplo, una proteína) unida al indicador y al anticuerpo utilizando una sonda molecular retenida en un nanoporo;
- 50 La **figura 20** es un flujo del procedimiento para caracterizar moléculas diana de diferentes muestras utilizando sondas moleculares retenidas en un nanoporo;
- La **figura 21** ilustra la unión de badenes a una región de dirección de una sonda molecular retenida en un nanoporo;
- 55 La **figura 22** ilustra un ejemplo de detector de nanoporo;
- La **figura 23** muestra la estructura de una sonda polinucleotídica;
- 60 La **figura 24** muestra un ejemplo de configuración de una cubeta de lectura;
- La **figura 25** muestra un ejemplo de un chip empaquetado;
- La **figura 26** muestra un ejemplo de una configuración de bomba de jeringa;
- 65 La **figura 27** muestra un ejemplo de una configuración de jeringa manual;

La **figura 28** muestra un ejemplo de formación de bicapa y salto automatizado con una bomba;

La **figura 29** muestra un ejemplo de una forma de onda aplicada;

La **figura 30** muestra un ejemplo de la corriente frente al tiempo para un canal abierto;

La **figura 31** muestra un ejemplo de la corriente frente al tiempo para un canal abierto;

La **figura 32** muestra un ejemplo de la corriente frente al tiempo para un canal abierto;

La **figura 33** muestra un ejemplo de la corriente frente al tiempo para la captura de ácido desoxirribonucleico (ADN);

La **figura 34** muestra un ejemplo de la corriente frente al tiempo para la captura de ADN;

La **figura 35** muestra un ejemplo de la corriente frente al tiempo para la captura de ADN;

La **figura 36** muestra un ejemplo de la corriente frente al tiempo para la captura de ADN;

La **figura 37** muestra un ejemplo de la corriente frente al tiempo para la captura de ADN; y

La **figura 38** muestra un ejemplo de la corriente frente al tiempo para los poros después de la formación de la bicapa.

Descripción detallada

Si bien en el presente documento se muestran y describen diversos modos de realización de la invención, será obvio para los expertos en la técnica que dichos modos de realización se proporcionan solo a modo de ejemplo. A los expertos en la técnica se les pueden ocurrir numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Se debe entender que se pueden emplear diversas alternativas a los modos de realización de la invención descritos en el presente documento.

El término "nanoporo", como se usa en el presente documento, se refiere en general a un poro, canal o paso formado o proporcionado de otro modo en una membrana. Una membrana puede ser una membrana orgánica, tal como una bicapa lipídica, o una membrana sintética, tal como una membrana formada por un material polimérico. La membrana puede ser un material polimérico. El nanoporo se puede disponer contiguo o cerca de un circuito de detección o un electrodo acoplado a un circuito de detección, tal como, por ejemplo, un semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS) o un transistor de efecto de campo (FET). En algunos ejemplos, un nanoporo tiene una anchura o diámetro característico del orden de 0,1 nanómetros (nm) hasta aproximadamente 1000 nm. Algunos nanoporos son proteínas. La hemolisina alfa es un ejemplo de un nanoporo proteico.

El término "polimerasa", como se usa en el presente documento, se refiere en general a cualquier enzima u otro catalizador molecular que puede catalizar una reacción de polimerización. Los ejemplos de polimerasas incluyen, sin limitación, una polimerasa de ácidos nucleicos o una ligasa. Una polimerasa puede ser una enzima de polimerización.

La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una molécula que comprende una o más subunidades de ácido nucleico. Un ácido nucleico puede incluir una o más subunidades seleccionadas de adenosina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U), o variantes de las mismas. Un nucleótido puede incluir A, C, G, T o U, o variantes de los mismos. Un nucleótido puede incluir cualquier subunidad que se pueda incorporar en una hebra de ácido nucleico en crecimiento. Dicha subunidad puede ser una A, C, G, T o U, o cualquier otra subunidad que sea específica de uno o más A, C, G, T o U complementarios, o complementaria de una purina (es decir, A o G, o variantes de las mismas) o de una pirimidina (es decir, C, T o U, o variantes de las mismas). Una subunidad puede permitir que se resuelvan bases de ácidos nucleicos individuales o grupos de bases (por ejemplo, AA, TA, AT, GC, CG, CT, TC, GT, TG, AC, CA o sus homólogos de uracilo). En algunos ejemplos, un ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), o variantes o derivados de los mismos. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario.

El término "polinucleótido" u "oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere en general a un polímero u oligómero que comprende uno o más nucleótidos. Un polinucleótido u oligonucleótido puede comprender un polinucleótido u oligonucleótido de ADN, un polinucleótido u oligonucleótido de ARN, o una o más secciones de polinucleótido u oligonucleótido de ADN y/o polinucleótido u oligonucleótido de ARN.

Como se usa en general en el presente documento, un "nucleótido" o "base" puede ser un nucleótido principal o un análogo nucleotídico. Un nucleótido principal es el monofosfato de desoxiadenosina (dAMP), monofosfato de desoxicitidina (dCMP), monofosfato de desoxiguanosina (dGMP), monofosfato de desoxitimidina (dTMP), monofosfato de adenosina (AMP), monofosfato de citidina (CMP), monofosfato de guanosina (GMP) o monofosfato de uridina (UMP). Un análogo nucleotídico es un análogo o un imitador de un nucleótido principal que tiene una modificación en

la base nitrogenada principal (A, C, G, T y U), la estructura de desoxirribosa/ribosa, el grupo fosfato del nucleótido principal, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, un análogo nucleotídico puede tener una base modificada, ya sea natural o artificial. Los ejemplos de bases modificadas incluyen, sin limitación, bases nitrogenadas metiladas, bases púricas modificadas (por ejemplo, hipoxantina, xantina, 7-metilguanina, isodG), bases pirimidínicas modificadas (por ejemplo, 5,6-dihidouracilo y 5-metilcitosina, isodC), bases universales (por ejemplo, 3-nitropirrol y 5-nitroindol), imitadores de bases sin unión (por ejemplo, 4-metilbenzimidazol y 2,4-difluorotolueno o benceno), y sin base (nucleótido abásico donde el análogo nucleotídico carece de base). Los ejemplos de análogos nucleotídicos que tienen modificada la estructura de desoxirribosa (por ejemplo, didesoxinucleósidos tales como didesoxiguanosina, didesoxiadenosina, didesoxitimidina y didesoxicitidina) y/o la de fosfato (conjuntamente denominadas cadena principal) incluyen, sin limitación, nucleótidos de glicol, morfolinos y nucleótidos bloqueados.

La expresión "polímero de prueba", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una molécula de polímero que pasa a través de o contigua a un nanoporo con fines de detección. El polímero de prueba puede comprender múltiples componentes básicos que tienen estructuras químicas similares. Los ejemplos de polímeros de prueba incluyen, sin limitación, polinucleótidos de prueba, péptidos/proteínas de prueba y glúcidos de prueba. Un polinucleótido de prueba puede ser un polinucleótido monocatenario de prueba (es decir, un polinucleótido mc de prueba) o un polinucleótido bicatenario de prueba (es decir, un polinucleótido bc de prueba). Los ejemplos de componentes básicos incluyen, sin limitación, nucleótidos, aminoácidos y monosacáridos.

La expresión "polinucleótido de muestra", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una molécula de ácido nucleico que puede comprender un polinucleótido de interés, tal como, por ejemplo, un polinucleótido monocatenario ("mc") de muestra (polinucleótido mc de muestra) o un polinucleótido bicatenario ("bc") de muestra (es decir, polinucleótido bc de muestra, tal como, por ejemplo, ADN bc de muestra, ARN bc de muestra, y ADN-ARN híbrido bc de muestra). Un polinucleótido de muestra puede ser un polinucleótido natural obtenido de una muestra biológica o un polinucleótido sintético. El polinucleótido sintético puede ser un polinucleótido obtenido mediante la modificación de un polinucleótido natural, tal como un polinucleótido preprocesado destinado para su uso en la identificación y/o secuenciación de polinucleótidos. Los ejemplos de dichos preprocesamientos incluyen, sin limitación, el enriquecimiento de fragmentos deseados en el polinucleótido de muestra, procesamiento de extremos pareados, procesamiento de lectura de parejas pareadas, preprocesamiento epigenético, incluido el tratamiento con bisulfuro, análisis de fragmentos focalizado por medio de RCP, secuenciación de fragmentos por RCP y análisis de fragmentos cortos de polinucleótidos.

La expresión "polinucleótido de prueba", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una molécula polinucleotídica que pasa a través de o contigua a un nanoporo con fines de detección. Un polinucleótido de prueba puede ser un polinucleótido monocatenario de prueba (es decir, un polinucleótido mc de prueba) y un polinucleótido bicatenario de prueba (es decir, un polinucleótido bc de prueba, tal como, por ejemplo, un ADN bc de prueba, un ARN bc de prueba y un ADN-ARN híbrido bc de prueba). Un polinucleótido mc de prueba, como se usa en el presente documento, comprende una sección de polinucleótido mc que se debe unir por un badén en un procedimiento descrito en el presente documento. Un polinucleótido mc de prueba puede comprender además un polinucleótido de muestra y otros restos funcionales (por ejemplo, estructura prevoluminosa, identificadores y marcas de aislamiento).

La expresión "estructura prevoluminosa", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una estructura molecular en una molécula polinucleotídica que puede formar una estructura voluminosa bajo ciertas condiciones (por ejemplo, a cierta temperatura, presencia/ausencia de cierto compuesto o compuestos). Ejemplos de estructuras prevoluminosas incluyen estructuras oligonucleotídicas. Una estructura prevoluminosa puede ser un polinucleótido mc o un polinucleótido bc.

La expresión "estructura voluminosa", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una estructura (por ejemplo, un nucleótido) formada a partir de una estructura prevoluminosa en una molécula polinucleotídica mc de prueba. La estructura voluminosa puede retardar o estancar la molécula polinucleotídica de prueba en un nanoporo en unas condiciones de trabajo hasta que las condiciones de trabajo cambian a otras condiciones en el que la estructura voluminosa se convierta en la estructura prevoluminosa u otras estructuras que pueden estancar la molécula polinucleotídica de prueba. Los ejemplos de estructuras voluminosas incluyen, sin limitación, estructuras 2-D y 3-D tales como estructuras polinucleotídicas bicatenarias (ARN bicatenario, ADN bicatenario o ARN-ADN híbrido), estructuras polinucleotídicas de horquilla, estructuras de múltiples horquillas y estructuras de múltiples brazos. En otro modo de realización, la estructura prevoluminosa forma una estructura voluminosa por medio de la interacción con un ligando específico de la estructura prevoluminosa. Los ejemplos de dicho par de estructura prevoluminosa/ligando incluyen, sin limitación, biotina/estreptavidina, antígeno/anticuerpo y glúcido/anticuerpo.

En un modo de realización, la estructura voluminosa se forma a partir de una estructura oligonucleotídica prevoluminosa, por ejemplo, una estructura oligonucleotídica formada a partir de una estructura prevoluminosa en una molécula polinucleotídica mc de prueba. Los ejemplos de estructuras polinucleotídicas u oligonucleotídicas voluminosas incluyen, sin limitación, hebras de ácido nucleico en horquilla, hebras de ácido nucleico de antisentido hibridado, moléculas de brazos múltiples y de ADN o ARN tridimensionales que se autohibridan. En otro modo de realización, la estructura voluminosa se forma por medio de interacciones de un par de estructura prevoluminosa/ligando como se describe en el presente documento.

El término "bicatenario", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una estructura, sección, región o segmento bicatenario. Un bicatenario puede incluir un ARN bicatenario, ADN bicatenario o una estructura, sección, región o segmento bicatenario de ADN-ARN.

5 El término "badén", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una molécula, tal como un oligonucleótido, que forma un complejo con un segmento de unión de una molécula polinucleotídica de prueba. En un ejemplo, cuando una molécula polinucleotídica de prueba viaja a través de o contigua a un nanoporo bajo un potencial eléctrico aplicado, el complejo formado entre un badén y el segmento de unión retarda o estanca la molécula polinucleotídica de prueba en el nanoporo o contigua al mismo durante un tiempo de permanencia suficiente para que el detector de nanoporo obtenga una señal de la molécula polinucleotídica de prueba, cuya señal puede proporcionar información acerca de la secuencia o estructura de la molécula polinucleotídica de prueba. Después del tiempo de permanencia, el complejo se disocia y la molécula polinucleotídica de prueba avanza a través del nanoporo.

15 La expresión "badén conocido", como se usa en el presente documento, se refiere en general a un badén que se une específicamente a una secuencia conocida en un polinucleótido mc de prueba. Debido a que el segmento de unión en el polinucleótido de la prueba mc (la secuencia conocida) es conocido, la estructura del badén también puede ser conocida (por ejemplo, complementaria a la secuencia conocida en el polinucleótido de la prueba mc).

20 La expresión "agrupación aleatoria de badenes", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una colección de badenes que se pueden unir a todas o sustancialmente a todas las secciones de una molécula polinucleotídica de prueba o a un fragmento de la misma. Un ejemplo de agrupación aleatoria de badenes comprende oligonucleótidos que tienen bases nitrogenadas universales que se emparejan por bases con todas las bases nitrogenadas principales (A, T, C, G y U). Otro ejemplo de agrupación aleatoria de badenes comprende oligonucleótidos de una longitud determinada que tienen todas las combinaciones posibles de bases nitrogenadas principales. Otro ejemplo de agrupación aleatoria de badenes comprende oligonucleótidos de una longitud determinada que tienen todas las combinaciones posibles de bases nitrogenadas principales y bases nitrogenadas universales. Otro ejemplo de conjunto aleatorio de badenes comprende los badenes que tienen bases nitrogenadas universales en posiciones designadas y todas las combinaciones de bases nitrogenadas principales en las demás posiciones. Otro ejemplo de badenes aleatorios es una combinación de badenes mc, que forman secciones bicatenarias con polinucleótido mc de prueba, y las secciones bicatenarias tienen aproximadamente la misma temperatura de fusión. Estos badenes mc pueden tener la misma o diferente longitud, y/o los mismos o diferentes nucleótidos.

35 El término "tapón", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una estructura que puede formar un complejo de tapón-polinucleótido de prueba con el polinucleótido de prueba y detener el flujo del complejo de tapón-polinucleótido de prueba antes de la zona de constricción del nanoporo durante el tiempo de permanencia. El tapón puede formar parte del polinucleótido de prueba, o ser una estructura separada (por ejemplo, un badén descrito en el presente documento, y una hebra de antisentido del polinucleótido de prueba formada en presencia de una nucleótido-polimerasa), o una enzima que se puede unir al polinucleótido de prueba y, en algunos casos, mover el polinucleótido de prueba a través del nanoporo.

45 El término "identificador", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una secuencia o estructura conocida en un polinucleótido de prueba que se puede detectar o identificar mediante el procedimiento descrito en el presente documento. Los ejemplos de identificadores incluyen, sin limitación, identificadores de dirección, identificadores de señal de referencia, identificadores de fuente de muestra e identificadores de muestra. Los identificadores pueden comprender uno o más nucleótidos o estructuras que proporcionan señales eléctricas distintivas que son identificables. Los ejemplos de dichos nucleótidos y estructuras incluyen, sin limitación, isodG, isodC, nucleótidos metilados, ácidos nucleicos bloqueados, nucleótidos universales y nucleótidos abásicos. En algunos modos de realización, un nucleótido abásico proporciona una señal más intensa que un nucleótido principal. Por tanto, la señal eléctrica detectada por un nanoporo para una secuencia que comprende nucleótidos abásicos y nucleótidos principales puede proporcionar una señal más intensa que la señal eléctrica obtenida a partir de secuencias de nucleótidos principales solamente. Por ejemplo, una secuencia de 4 a 5 bases que comprende aproximadamente un 25 % de nucleótidos abásicos puede proporcionar una señal con una intensidad más del doble que una secuencia de 4 a 5 bases que comprende solo nucleótidos principales. Cuantos más nucleótidos abásicos tenga la secuencia, más intensa será la señal eléctrica de la secuencia. Por tanto, los identificadores pueden proporcionar señales eléctricas de una intensidad deseada (por ejemplo, con una intensidad aproximadamente doble, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o aproximadamente 10 veces mayor que las de los oligonucleótidos principales que tienen la misma longitud) cambiando la cantidad de nucleótidos abásicos en las secuencias del identificador.

60 La expresión "identificador de dirección", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una secuencia conocida situada al menos a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 50 bases de una estructura voluminosa formada a partir de una estructura prevoluminosa (la sección sombreada en la molécula polinucleotídica mc de prueba, como se muestra en la **figura 17**). En algunos ejemplos, cuando se forma una estructura voluminosa, puede impedir que una molécula polinucleotídica mc de prueba fluya a través de un nanoporo dentro del que se incorpora la molécula polinucleotídica mc de prueba. En un ejemplo, cuando la estructura voluminosa

se estanca, se retarda o se detiene dentro del nanoporo o contigua al mismo, se puede obtener un conjunto de señales eléctricas, que pueden proporcionar información de la secuencia que está por delante de la estructura voluminosa y el primer par de bases de la estructura voluminosa, en la dirección del flujo de la molécula polinucleotídica mc de prueba. Cuando se conoce la secuencia, dichas señales eléctricas pueden, sin limitación: (1) verificar que la estructura prevoluminosa se haya convertido correctamente en la estructura voluminosa, de modo que la estructura voluminosa impida que la molécula polinucleotídica mc de prueba fluya a través del nanoporo; (2) indicar que la molécula polinucleotídica mc de prueba ha alcanzado un extremo de la sección monocatenaria del polinucleótido mc de prueba, y/o (3) servir como lectura de referencia o calibración para basar otras señales eléctricas obtenidas en el mismo nanoporo. En algunos modos de realización, el identificador de dirección comprende uno o más nucleótidos o estructuras que proporcionan señales eléctricas distintivas que se identifican fácilmente. Los ejemplos de dichos nucleótidos y estructuras incluyen, sin limitación, isodG, isodC y nucleótidos abásicos.

La expresión "identificador de la señal de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una secuencia conocida en un polinucleótido de prueba, que cuando se detecta o identifica mediante los procedimientos descritos en el presente documento, puede servir como lectura de referencia o calibración para que sea el punto de partida de otras señales eléctricas obtenidas en el mismo nanoporo.

La expresión "identificador de la fuente de la muestra", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una secuencia conocida en un polinucleótido de prueba, que cuando se detecta o identifica mediante los procedimientos descritos en el presente documento, se puede usar para identificar la fuente del polinucleótido de muestra.

La expresión "identificador de la muestra", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una secuencia conocida en un polinucleótido de prueba, que cuando se detecta o identifica mediante los procedimientos descritos en el presente documento, se puede usar para identificar el polinucleótido de muestra individual.

La expresión "identificador del conector", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una secuencia conocida en un polinucleótido de prueba, que cuando se detecta o identifica mediante los procedimientos descritos en el presente documento, se puede usar para indicar la transición entre la sección del polinucleótido de muestra y la sección del polinucleótido de antisentido. En un ejemplo, cuando se detecta o identifica el identificador del conector, la sección del polinucleótido de muestra/antisentido ha pasado a través del nanoporo.

El "identificador de la fuente de la sonda", como se usa en el presente documento, es una secuencia conocida en una sonda polinucleotídica, que cuando se detecta o identifica por el procedimiento descrito en el presente documento, se usa para identificar la fuente de la que proviene la sonda polinucleotídica.

El "identificador de la sonda", como se usa en el presente documento, es una secuencia conocida en una sonda polinucleotídica, que cuando se detecta o identifica por el procedimiento descrito en el presente documento, se usa para identificar el polinucleótido de muestra individual.

La sección "sitio de unión para la molécula indicadora" se une a una molécula indicadora como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, la molécula indicadora comprende ADN, ARN o cualquier combinación de los mismos.

El "identificador del indicador", como se usa en el presente documento, es una secuencia conocida en una sonda polinucleotídica, que cuando se detecta o identifica mediante el procedimiento descrito en el presente documento, se usa para indicar la unión de la molécula indicadora a la sonda polinucleotídica.

Detección con nanoporos

En el presente documento se proporcionan sistemas y procedimientos para identificar una molécula o parte de ella con un nanoporo. Un procedimiento para identificar una especie, tal como una molécula o una parte de la misma, con un nanoporo puede comprender proporcionar un biochip (también llamado "chip" en el presente documento) que comprende al menos un nanoporo en una membrana que está dispuesta contigua o cerca de un electrodo. El electrodo se puede adaptar para detectar una corriente que pasa a través del nanoporo. El procedimiento puede incluir además insertar una molécula o una parte de la misma en el nanoporo y variar una tensión aplicada a través del nanoporo y/o a través de la membrana. En algunos casos, el procedimiento incluye medir la corriente a una pluralidad de tensiones para identificar la molécula o parte de la misma. En algunos modos de realización, la corriente a una pluralidad de tensiones comprende una firma electrónica y comprende además la comparación de la firma electrónica con una pluralidad de firmas electrónicas de referencia para identificar la molécula o parte de la misma.

El nanoporo se puede formar o incluir de otro modo en una membrana dispuesta contigua a un electrodo de detección de un circuito de detección, tal como un circuito integrado. El circuito integrado puede ser un circuito integrado para aplicaciones específicas (ASIC). En algunos ejemplos, el circuito integrado es un transistor de efecto de campo o un semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS). El circuito de detección puede estar situado en un chip u otro dispositivo que tenga el nanoporo, o fuera del chip o dispositivo, tal como en una configuración fuera de chip. El

semiconductor puede ser cualquier semiconductor, incluyendo, sin limitación, los semiconductores del grupo IV (por ejemplo, silicio) y del grupo III-V (por ejemplo, arseniuro de galio).

La **figura 1** muestra un ejemplo de un detector (o sensor) de nanoporo que tiene control de la temperatura, que se puede preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2011/0193570, que se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia. Con referencia a la **figura 1A**, el detector de nanoporo comprende un electrodo superior **101** en contacto con una solución conductora (por ejemplo, solución salina) **107**. Un electrodo conductor inferior **102** está cerca, contiguo o en proximidad a un nanoporo **106**, que se inserta en una membrana **105**. En algunos casos, el electrodo conductor inferior **102** está incluido en un semiconductor **103** en el que están incluidos circuitos eléctricos en un sustrato semiconductor **104**. Una superficie del semiconductor **103** se puede tratar para que sea hidrófoba. Una muestra que se va a detectar atraviesa el poro del nanoporo **106**. El sensor del chip semiconductor está colocado en el paquete **208** y este, a su vez, está próximo a un elemento de control de temperatura **109**. El elemento de control de temperatura **109** puede ser un dispositivo de calefacción y/o refrigeración termoeléctrico (por ejemplo, un dispositivo Peltier). En algunos casos, la bicapa abarca y cubre el electrodo **202**.

Múltiples detectores de nanoporo pueden formar una matriz de nanoporos. Una matriz de nanoporos puede incluir uno o más detectores de nanoporo. En algunos casos, una matriz de nanoporos incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 1000, 10000 o 100,000 detectores de nanoporo. Un detector de nanoporo individual puede incluir uno o más nanoporos contiguos a un electrodo de detección (por ejemplo, electrodo conductor inferior **102**). En algunos casos, un detector de nanoporo individual incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 100 nanoporos contiguos a un electrodo de detección.

Con referencia a la **figura 1B**, donde los números similares representan elementos similares, la membrana **105** se puede disponer sobre un pocillo **110**, donde el sensor **102** forma parte de la superficie del pocillo. La **figura 1C** muestra un ejemplo en el que el electrodo **102** sobresale de la superficie semiconductor tratada **103**.

En algunos ejemplos, la membrana **105** se forma en el electrodo conductor inferior **102** y no en el semiconductor **103**. La membrana **105** en tal caso puede formar interacciones de acoplamiento con el electrodo conductor inferior **102**. En algunos casos, sin embargo, la membrana **105** se forma en el electrodo conductor inferior **102** y en el semiconductor **103**. Como alternativa, la membrana **105** se puede formar en el semiconductor **103** y no en el electrodo conductor inferior **102**, pero se puede extender sobre el electrodo conductor inferior **102**.

Muchos tipos diferentes de moléculas o partes de las mismas se pueden detectar mediante los procedimientos y/o dispositivos descritos en el presente documento. La **figura 2** muestra algunos ejemplos de moléculas que se pueden detectar y procedimientos para secuenciar polímeros que incluyen ácidos nucleicos. En algunos casos, la molécula **201** pasa a través del nanoporo **202** desde el lado cis **203** (lejos del electrodo) al lado trans **204** (hacia el electrodo) de la membrana **205**.

Como se ve en la **figura 2B**, la molécula puede ser una molécula de polímero **206** y se pueden identificar partes de la molécula de polímero **207** a medida que la molécula de polímero pasa a través del nanoporo. La molécula de polímero puede ser una molécula biológica tal como un ácido nucleico o una proteína. En algunos modos de realización, la molécula de polímero es un ácido nucleico y las partes de la molécula de polímero son ácidos nucleicos o grupos de ácidos nucleicos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 ácidos nucleicos). En algunos modos de realización, la molécula de polímero es un polipéptido y las partes del polipéptido son aminoácidos o grupos de ácidos nucleicos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos).

En algunos casos, a medida que un ácido nucleico o marca fluye a través de o contiguo al nanoporo, el circuito de detección detecta una señal eléctrica asociada con el ácido nucleico o marca. El ácido nucleico puede ser una subunidad de una hebra más grande. La marca puede ser un subproducto de un acontecimiento de incorporación de nucleótidos u otra interacción entre un ácido nucleico marcado y el nanoporo o una especie contigua al nanoporo, tal como una enzima que escinde una marca de un ácido nucleico. La marca puede permanecer unida al nucleótido. Una señal detectada se puede recoger y almacenar en una ubicación de memoria, y usarse más tarde para construir una secuencia del ácido nucleico. La señal recogida se puede procesar para justificar cualquier anomalía en la señal detectada, tal como errores.

Como se ve en la **figura 2C**, en algunos modos de realización, la molécula **208** (por ejemplo, una "molécula marcadora") está unida a un nucleótido **209**. La molécula se puede identificar mientras el nucleótido se incorpora a una cadena de ácido nucleico en crecimiento **210** (por ejemplo, mediante una polimerasa **211**). El nucleótido se puede incorporar de acuerdo con la coincidencia de pares de bases con un ácido nucleico de plantilla **212**. Si se unen diferentes marcas a cada uno de los diferentes nucleótidos (por ejemplo, A, C, T y G), la secuencia del ácido nucleico de plantilla se puede determinar detectando las moléculas marcadoras con el nanoporo (por ejemplo, sin que pase el ácido nucleico de plantilla a través del nanoporo). En algunos modos de realización, la molécula se libera **213** del nucleótido tras la incorporación del nucleótido a una cadena de ácido nucleico en crecimiento. Como se muestra en la **figura 2D**, la molécula se puede detectar mientras el nucleótido se incorpora a la hebra en crecimiento y/o antes de su liberación del nucleótido **214**. En algunos casos, la región de dirección de la región de sonda o indicadora se

secuencia usando marcas.

Configuración del dispositivo

5 La **figura 3** ilustra esquemáticamente un dispositivo **300** (o sensor) de nanoporo que se puede usar para detectar una molécula (y/o secuenciar un ácido nucleico) como se describe en el presente documento. La bicapa lipídica que contiene el nanoporo se puede caracterizar por una resistencia y capacidad. El dispositivo de nanoporo **300** incluye una bicapa lipídica **302** formada sobre una superficie compatible con la bicapa lipídica **304** de un sustrato conductor sólido **306**, donde la superficie compatible con la bicapa lipídica **304** se puede aislar mediante superficies incompatibles con la bicapa lipídica **305** y el sustrato conductor sólido **306** se puede aislar eléctricamente mediante materiales aislantes **307**, y donde la bicapa lipídica **302** puede estar rodeada por un lípido amorfo **303** formado sobre la superficie incompatible con la bicapa lipídica **305**. La bicapa lipídica **302** puede tener incluida una única estructura de nanoporo **308** que tiene un nanoporo **310** lo suficientemente grande para que pasen las moléculas detectadas y/o los iones pequeños (por ejemplo, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻) entre los dos lados de la bicapa lipídica **302**. Una capa de moléculas de agua **314** puede estar adsorbida en la superficie compatible con la bicapa lipídica **304** e intercalada entre la bicapa lipídica **302** y la superficie compatible con la bicapa lipídica **304**. La película acuosa **314** adsorbida en la superficie hidrófila compatible con la bicapa lipídica **304** puede promover el ordenamiento de las moléculas lipídicas y facilitar la formación de la bicapa lipídica en la superficie compatible con la bicapa lipídica **304**. Sobre la bicapa lipídica **302** se puede proporcionar una cámara de muestras **316** que contiene una solución de la molécula que se va a detectar (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico, en algunos casos con nucleótidos marcados u otros componentes según sea necesario) **312**. La solución puede ser una solución acuosa que contenga electrolitos y se encuentre amortiguada a una concentración iónica óptima y se mantenga a un pH óptimo para mantener abierto el nanoporo **310**. El dispositivo incluye un par de electrodos **318** (incluyendo un nodo negativo **318a** y un nodo positivo **318b**) acoplado a una fuente de tensión variable **320** para proporcionar estímulo eléctrico (por ejemplo, polarización de tensión) a través de la bicapa lipídica y para detectar características eléctricas de la bicapa lipídica (por ejemplo, resistencia, capacidad y flujo de corriente iónica). La superficie del electrodo positivo **318b** es la superficie compatible con la bicapa lipídica **304** o forma parte de ella. El sustrato sólido conductor **306** se puede acoplar a uno de los electrodos **318** o formar parte del mismo. El dispositivo **300** también puede incluir un circuito eléctrico **322** para controlar la estimulación eléctrica y para procesar la señal detectada. En algunos modos de realización, la fuente de tensión (por ejemplo, variable) **320** se incluye como parte del circuito eléctrico **322**. Los circuitos eléctricos **322** pueden incluir amplificador, integrador, filtro de ruido, lógica de control de realimentación y/o diversos otros componentes. Los circuitos eléctricos **322** pueden ser circuitos eléctricos integrados que estén integrados dentro de un sustrato de silicio **328** y pueden estar acoplados además a un procesador informático **324** acoplado a una memoria **326**.

35 La superficie compatible con la bicapa lipídica **304** se puede formar a partir de diversos materiales que son adecuados para la transducción iónica y la formación de gas para facilitar la formación de la bicapa lipídica. En algunos modos de realización, se pueden usar materiales hidrófilos conductores o semiconductores porque pueden permitir una mejor detección de un cambio en las características eléctricas de la bicapa lipídica. Los materiales de ejemplo incluyen Ag-AgCl, Au, Pt o silicio dopado u otros materiales semiconductores. En algunos casos, el electrodo no es un electrodo fungible.

45 La superficie incompatible con la bicapa lipídica **305** se puede formar a partir de diversos materiales que no son adecuados para la formación de la bicapa lipídica y son típicamente hidrófobos. En algunos modos de realización, se prefieren materiales hidrófobos no conductores, ya que aíslan eléctricamente las regiones de la bicapa lipídica además de separar las regiones de la bicapa lipídica entre sí. Los ejemplos de materiales incompatibles con la bicapa lipídica incluyen, por ejemplo, nitruro de silicio (por ejemplo, Si₃N₄) y teflón, óxido de silicio (por ejemplo, SiO₂) silanizado con moléculas hidrófobas.

50 En un ejemplo, el dispositivo de nanoporo **300** de la **figura 3** es un dispositivo de nanoporo de hemolisina alfa (aHL) que tiene una única proteína de hemolisina alfa (aHL) **308** incluida en una bicapa lipídica de difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC) **302** formada sobre una superficie de plata (Ag) compatible con la bicapa lipídica **304** revestida sobre un material de aluminio **306**. La superficie de Ag compatible con la bicapa lipídica **304** está aislada mediante superficies de nitruro de silicio incompatibles con la bicapa lipídica **305**, y el material de aluminio **306** está aislado eléctricamente con materiales de nitruro de silicio **307**. El aluminio **306** está acoplado a circuitos eléctricos **322** que están integrados en un sustrato de silicio **328**. Un electrodo de cloruro de plata y plata colocado en un chip o extendido hacia abajo desde una placa de cobertura **328** entra en contacto con una solución acuosa que contiene moléculas (por ejemplo, ácido nucleico).

60 El nanoporo de aHL es un conjunto de siete péptidos individuales. La entrada o el vestíbulo del nanoporo de aHL tiene aproximadamente 26 angstroms de diámetro, que es lo suficientemente ancho como para dar cabida a una parte de una molécula de ADNbc. Desde el vestíbulo, el nanoporo de aHL primero se ensancha y a continuación se estrecha para formar un barril que tiene un diámetro de aproximadamente 15 angstroms, que es lo suficientemente ancho para permitir el paso de una sola molécula de ADNmc (o moléculas marcadoras más pequeñas), pero no lo suficientemente ancho como para permitir el paso de una molécula de ADNbc (o moléculas marcadoras más grandes).

65 Además de la DPhPC, la bicapa lipídica del dispositivo de nanoporo se puede ensamblar a partir de otros diversos

materiales anfipáticos adecuados, seleccionados basándose en diversas consideraciones, tales como el tipo de nanoporo utilizado, el tipo de molécula que se va a caracterizar y diversas características físicas, químicas y/o eléctricas de la bicapa lipídica formada, tales como estabilidad y permeabilidad, resistencia y capacidad de la bicapa lipídica formada. Entre los ejemplos de materiales anfipáticos se incluyen diversos fosfolípidos, tales como palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC) y dioleoilfosfatidilmetiléster (DOPME), difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y esfingomielina.

Además del nanoporo de aHL que se muestra anteriormente, el nanoporo puede ser de diversos otros tipos de nanoporos. Los ejemplos incluyen hemolisina y leucocidina, melitina, porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA) y diversos otros nanoporos naturales, naturales modificados y sintéticos. Se puede seleccionar un nanoporo adecuado basándose en diversas características de la molécula del analito, tales como el tamaño de la molécula del analito en relación con el tamaño de poro del nanoporo. Por ejemplo, el nanoporo de aHL, que tiene un tamaño de poro restrictivo de aproximadamente 15 angstroms.

Medición de la corriente

En algunos casos, la corriente se puede medir a diferentes tensiones aplicadas. Para lograr esto, se puede aplicar un potencial deseado al electrodo, y el potencial aplicado se puede mantener posteriormente a lo largo de la medición. En una implementación, se puede usar una topología de integrador amplificador operacional (op-amp) para este propósito como se describe en el presente documento. El integrador mantiene el potencial de tensión en el electrodo por medio de retroalimentación capacitiva. El circuito integrador puede proporcionar una linealidad sobresaliente, coincidencia entre celdas y características de desplazamiento. El integrador op-amp típicamente requiere un tamaño grande para lograr el rendimiento requerido. En el presente documento se describe una topología de integrador más compacta.

En algunos casos, se puede aplicar a la cámara un potencial de tensión "Vliquid" que proporciona un potencial eléctrico común (por ejemplo, 350 mV) para todas las celdas del chip. El circuito integrador puede inicializar el electrodo (que es eléctricamente la placa superior del condensador integrador) a un potencial mayor que el potencial del líquido común. Por ejemplo, la polarización a 450 mV puede dar un potencial positivo de 100 mV entre el electrodo y el líquido. Este potencial de tensión positivo puede hacer que una corriente fluya desde el electrodo al contacto de la cámara de líquido. En este caso, los portadores son: (a) iones K⁺ que fluyen a través del poro desde el lado del electrodo (trans) de la bicapa al lado del depósito de líquido (cis) de la bicapa y (b) iones de cloro (Cl⁻) en el lado trans que reaccionan con el electrodo de plata según la siguiente reacción electroquímica: $\text{Ag} + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl} + \text{e}^-$.

En algunos casos, K⁺ sale de la celda contenida (del lado trans al lado cis de la bicapa) mientras que Cl⁻ se convierte en cloruro de plata. El lado del electrodo de la bicapa se puede desalinizar como resultado del flujo de corriente. En algunos casos, un material esponjoso líquido o una matriz de plata/cloruro de plata puede servir como depósito para suministrar iones de Cl⁻ en la reacción inversa que se produce en el contacto eléctrico de la cámara para completar el circuito.

En algunos casos, los electrones fluyen finalmente hacia el lado superior del condensador integrador, lo que crea la corriente eléctrica que se mide. La reacción electroquímica convierte la plata en cloruro de plata y la corriente continuará fluyendo solo mientras haya plata disponible para convertir. En algunos casos el suministro limitado de plata da lugar a una vida útil del electrodo dependiente de la corriente. En algunos modos de realización, se utilizan materiales de electrodo que no se agotan (por ejemplo, platino).

En la **figura 4** se muestra un ejemplo de circuitos de la celda. Se aplica una tensión aplicada V_a a un op-amp **1200** por delante de una puerta transportadora de corriente MOSFET **401**. También se muestran aquí un electrodo **402** y la resistencia del ácido nucleico y/o marca detectada por el dispositivo **403**.

Una tensión aplicada V_a puede impulsar la puerta transportadora de corriente **401**. La tensión resultante en el electrodo es entonces $V_a - V_t$ donde V_t es la tensión de umbral del MOSFET. En algunos casos, esto da como resultado un control limitado de la tensión real aplicada al electrodo, ya que la tensión de umbral de un MOSFET puede variar considerablemente con el procedimiento, la tensión, la temperatura e incluso entre dispositivos dentro de un chip. Esta variación de V_t puede ser mayor en niveles de corriente bajos, donde pueden entrar en juego efectos de fuga subliminal. Por lo tanto, para proporcionar mejor control de la tensión aplicada, se puede utilizar un op-amp en una configuración de retroalimentación de seguimiento con el dispositivo transportador de corriente. Esto asegura que la tensión aplicada al electrodo sea V_a , independientemente de la variación de la tensión de umbral del MOSFET.

Matrices de nanoporos

La divulgación proporciona una matriz de detectores (o sensores) de nanoporos para detectar moléculas y/o secuenciar ácidos nucleicos. Con referencia a la **figura 5**, se puede detectar y/o secuenciar una pluralidad de moléculas (por ejemplo, ácido nucleico) en una matriz de detectores de nanoporo. Aquí, cada ubicación de nanoporo (por ejemplo, **501**) comprende un nanoporo, que en algunos casos se puede unir a una enzima polimerasa y/o enzimas

fosfatasa. En general, también hay un sensor en cada ubicación de la matriz como se describe en el presente documento. En algunos ejemplos, se proporciona una matriz de nanoporos unidos a una polimerasa de ácido nucleico, y se incorporan nucleótidos marcados con la polimerasa. Durante la polimerización, el nanoporo detecta una marca (por ejemplo, liberándola y pasándola al interior o a través del nanoporo, o presentándola al nanoporo).

La matriz de nanoporos puede tener cualquier número adecuado de nanoporos. En algunos casos, la matriz comprende aproximadamente 200, aproximadamente 400, aproximadamente 600, aproximadamente 800, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 10 000, aproximadamente 15 000, aproximadamente 20 000, aproximadamente 40 000, aproximadamente 60 000, aproximadamente 80 000, aproximadamente 100 000, aproximadamente 200 000, aproximadamente 400 000, aproximadamente 600 000, aproximadamente 800 000, aproximadamente 1 000 000 nanoporos y cifras similares. En algunos casos, la matriz comprende al menos 200, al menos 400, al menos 600, al menos 800, al menos 1000, al menos 1500, al menos 2000, al menos 3000, al menos 4000, al menos 5000, al menos 10 000, al menos 15 000, al menos 20 000, al menos 40 000, al menos 60 000, al menos 80 000, al menos 100 000, al menos 200 000, al menos 400 000, al menos 600 000, al menos 800 000 o al menos 1 000 000 nanoporos.

La matriz de detectores de nanoporo puede tener una densidad elevada de sitios discretos. Por ejemplo, un número relativamente grande de sitios por unidad de superficie (es decir, densidad) permite la construcción de dispositivos más pequeños, que son portátiles, de bajo coste o tienen otros rasgos característicos ventajosos. Un sitio individual en la matriz puede ser un sitio direccionable individualmente. Un gran número de sitios que comprenden un nanoporo y un circuito de detección pueden permitir la secuenciación simultánea de un número relativamente grande de moléculas de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, mediante secuenciación paralela. Dicho sistema puede aumentar el rendimiento y/o disminuir el coste de secuenciar una muestra de ácido nucleico.

La superficie comprende cualquier densidad adecuada de sitios discretos (por ejemplo, una densidad adecuada para secuenciar una muestra de ácido nucleico en un tiempo determinado o por un coste determinado). Cada sitio discreto puede incluir un sensor. La superficie puede tener una densidad de sitios discretos mayor o igual a aproximadamente 500 sitios por 1 mm². En algunos modos de realización, la superficie tiene una densidad de sitios discretos de aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000, aproximadamente 9000, aproximadamente 10 000, aproximadamente 20 000, aproximadamente 40 000, aproximadamente 60 000, aproximadamente 80 000, aproximadamente 100 000 o aproximadamente 500 000 sitios por 1 mm². En algunos casos, la superficie tiene una densidad de sitios discretos de al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 900, al menos 1000, al menos 2000, al menos 3000, al menos 4000, al menos 5000, al menos 6000, al menos 7000, al menos 8000, al menos 9000, al menos 10 000, al menos 20 000, al menos 40 000, al menos 60 000, al menos 80 000, al menos 100 000 o al menos 500 000 sitios por 1 mm².

En algunos ejemplos, un chip de prueba incluye una matriz de 264 sensores organizados en cuatro grupos separados (también llamados bancos) de 66 celdas de sensores cada uno. Cada grupo se divide a su vez en tres "columnas" con 22 "celdas" de sensores en cada columna. El nombre de "celda" es apropiado dado que idealmente encima de cada uno de los 264 sensores de la matriz se forma una celda virtual que comprende una bicapa lipídica y un nanoporo insertado (aunque el dispositivo puede funcionar con éxito con solo una fracción de las celdas del sensor así equipadas).

Existe una única almohadilla analógica de E/S que aplica un potencial de tensión al líquido contenido dentro de un cilindro conductor montado en la superficie de la matriz. Este potencial "líquido" se aplica al lado superior del poro y es común a todas las celdas de una matriz de detectores. El lado inferior del poro tiene un electrodo descubierto y cada celda del sensor puede aplicar a su electrodo un potencial inferior distinto. A continuación, se mide la corriente entre la conexión del líquido superior y la conexión del electrodo de cada celda en el lado inferior del poro. La célula del sensor mide la corriente que viaja a través del poro según la modulación de la molécula marcadora que pasa por el interior del poro.

Sistemas informáticos

Los dispositivos, sistemas y procedimientos de la divulgación se pueden regular con la ayuda de sistemas informáticos. La **figura 6** muestra un sistema **600** que comprende un sistema informático **601** acoplado a un sistema de detección y/o secuenciación de ácidos nucleicos con nanoporos **602**. El sistema informático **601** puede ser un servidor o una pluralidad de servidores. El sistema informático **601** se puede programar para regular la preparación y el procesamiento de muestras, y la secuenciación de ácidos nucleicos mediante el sistema de secuenciación **602**. El sistema de detección y/o secuenciación con nanoporos **602** puede ser un secuenciador (o detector) basado en nanoporos, como se describe en el presente documento.

El sistema informático se puede programar para implementar los procedimientos de la divulgación. El sistema

informático **601** incluye una unidad central de procesamiento (CPU, también "procesador" en el presente documento) **605**, que puede ser un procesador de núcleo único o de varios núcleos, o una pluralidad de procesadores para procesamiento paralelo. El procesador **605** puede formar parte de un circuito, tal como un circuito integrado. En algunos ejemplos, el procesador **605** se puede integrar en un circuito integrado para aplicaciones específicas (ASIC).
 5 El sistema informático **601** también incluye memoria **610** (por ejemplo, memoria de acceso aleatorio, memoria de solo lectura, memoria flash), unidad de almacenamiento electrónico **615** (por ejemplo, disco duro), interfaz de comunicaciones **620** (por ejemplo, adaptador de red) para que se comunique con uno o más sistemas y dispositivos periféricos diferentes **625**, tales como caché, otra memoria, almacenamiento de datos y/o adaptadores de pantalla electrónica. La memoria **610**, la unidad de almacenamiento **615**, la interfaz **620** y los dispositivos periféricos **625** están
 10 en comunicación con la CPU **605** a través de un bus de comunicaciones (líneas continuas), tal como una placa base. La unidad de almacenamiento **615** puede ser una unidad de almacenamiento de datos (o repositorio de datos) para almacenar datos. El sistema informático **601** puede estar acoplado operativamente a una red informática ("red") con la ayuda de la interfaz de comunicaciones **620**. La red puede ser Internet, una internet y/o extranet, o una intranet y/o extranet que esté en comunicación con Internet. La red puede incluir uno o más servidores informáticos, que pueden
 15 permitir el procesamiento distribuido.

En algunos ejemplos, el sistema informático **601** incluye una matriz de puertas programables (FPGA). En tal caso se puede excluir el procesador **605**.

20 Los procedimientos de la divulgación se pueden implementar por medio de un código ejecutable (o programa informático) de máquina (o procesador informático) almacenado en una ubicación de almacenamiento electrónico del sistema informático **601**, tal como, por ejemplo, en la unidad de memoria **610** o de almacenamiento electrónico **615**. Durante el uso, el procesador **605** puede ejecutar el código. En algunos casos, el código se puede recuperar de la unidad de almacenamiento **615** y almacenarse en la memoria **610** para que el procesador **605** pueda acceder
 25 fácilmente. En algunas situaciones se puede excluir la unidad de almacenamiento electrónico **615** y las instrucciones ejecutables por máquina se almacenan en la memoria **610**.

El código puede estar precompilado y configurado para su uso con una máquina que tenga un procesador adaptado para ejecutar el código, o se puede compilar durante el tiempo de ejecución. El código se puede suministrar en un
 30 lenguaje de programación que se puede seleccionar para permitir que el código se ejecute de manera precompilada o compilada.

El sistema informático **601** se puede adaptar para almacenar información de perfiles de usuario, tal como, por ejemplo, un nombre, dirección física, dirección de correo electrónico, número de teléfono, identificador de mensajería instantánea (IM), información académica, información laboral, número de "me gusta" y/o "no me gusta" en redes
 35 sociales y otra información de interés potencial para el usuario u otros usuarios. Dicha información de perfiles se puede almacenar en la unidad de almacenamiento **615** del sistema informático **601**. El sistema de detección y/o secuenciación de ácidos nucleicos con nanoporos **602** se puede acoplar directamente al sistema informático **601** o pasar por la nube (por ejemplo, Internet) **630**.

40 Aspectos de los sistemas y procedimientos proporcionados en el presente documento, tal como el sistema informático **601**, se pueden incorporar en la programación. Diversos aspectos de la tecnología se pueden considerar como "productos" o "artículos de elaboración", típicamente en forma de código ejecutable por máquina (o procesador) y/o datos asociados que se incluyen o incorporan en un tipo de medio legible por la máquina. El código ejecutable por
 45 máquina se puede almacenar en una unidad de almacenamiento electrónico, como la memoria (por ejemplo, ROM, RAM) o un disco duro. Los medios de tipo "almacenamiento" pueden incluir cualquiera memoria tangible, o toda ella, de los ordenadores, procesadores o similares, o módulos asociados a los mismos, tales como diversas memorias de semiconductores, unidades de cinta, unidades de disco y similares, que pueden proporcionar almacenamiento no transitorio en cualquier momento para la programación del software. En ocasiones, todo el programa informático o parte del mismo se puede comunicar a través de Internet u otras diversas redes de telecomunicaciones. Dichas
 50 comunicaciones, por ejemplo, pueden permitir la carga del software desde un ordenador o procesador a otro, por ejemplo, desde un servidor de administración o equipo host a la plataforma informática de un servidor de aplicaciones. Por tanto, otro tipo de medios que pueden soportar los elementos del software incluyen ondas ópticas, eléctricas y electromagnéticas, tales como las que se utilizan en las interfaces físicas entre dispositivos locales, a través de redes
 55 fijas por cable y ópticas y a través de diversos enlaces aéreos. Los elementos físicos que transportan dichas ondas, tales como enlaces por cable o inalámbricos, enlaces ópticos o similares, también se pueden considerar como medios que soportan el software. Como se usa en el presente documento, a menos que esté restringido a medios tangibles de "almacenamiento" no transitorios, las expresiones tales como "medio legible" por ordenador o máquina se refieren a cualquier medio que participe en proporcionar instrucciones a un procesador para su ejecución.

60 Por tanto, un medio legible por máquina, tal como un código ejecutable por ordenador, puede adoptar muchas formas, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, un medio de almacenamiento tangible, un medio de ondas portadoras o un medio de transmisión física. Los medios de almacenamiento no volátiles incluyen, por ejemplo, discos ópticos o magnéticos, tales como cualquiera de los dispositivos de almacenamiento en cualquier ordenador o similar, tales como
 65 los que se pueden usar para implantar las bases de datos, etc. que se muestran en los dibujos. Los medios de almacenamiento volátiles incluyen memoria dinámica, tal como la memoria principal de dicha plataforma informática.

Los medios de transmisión tangibles incluyen cables coaxiales, cable de cobre y fibra óptica, incluyendo los cables que conforman un bus dentro de un sistema informático. Los medios de transmisión de onda portadora pueden tomar la forma de señales eléctricas o electromagnéticas, u ondas acústicas o lumínicas, tales como las generadas durante las comunicaciones de datos por radiofrecuencia (RF) e infrarrojos (IR). Por lo tanto, las formas frecuentes de medios legibles por ordenador incluyen, por ejemplo, un disquete, un disco flexible, disco duro, cinta magnética, cualquier otro medio magnético, un CD-ROM, DVD o DVD-ROM, cualquier otro medio óptico, tarjetas perforadas, cinta de papel, cualquier otro medio de almacenamiento físico con patrones de orificios, una RAM, una ROM, una PROM y una EPROM, una FLASH-EPROM, cualquier otro chip o cartucho de memoria, una onda portadora que transporte datos o instrucciones, cables o enlaces que transporten dicha onda portadora, o cualquier otro medio desde el que una ordenador pueda leer código y/o datos de programación. Muchas de estas formas de medios legibles por ordenador pueden participar en el transporte de una o más secuencias de una o más instrucciones a un procesador para su ejecución.

Formación de bicapas

Aquí se describen procedimientos para crear bicapas lipídicas y nanoporos en una matriz de electrodos (por ejemplo, controlados individualmente) que conforman un chip sensor semiconductor con nanoporos. El chip se puede usar para determinar secuencias de polímeros tal como la secuencia de un ácido nucleico.

En el presente documento se describen técnicas para formar bicapas lipídicas sobre una matriz de electrodos en un chip sensor semiconductor. En un modo de realización, se insertan líquidos que contienen moléculas lipídicas en la superficie del chip. Los líquidos están separados por burbujas. Las moléculas lipídicas se pueden distribuir en la superficie y las burbujas diluyen los lípidos para formar espontáneamente una bicapa lipídica sobre cada uno de los electrodos. Se puede aplicar un estímulo eléctrico adicional a los electrodos para facilitar la formación de la bicapa. Sobre los lípidos depositados se pueden aplicar adicionalmente soluciones que contienen proteína de nanoporo. Se pueden hacer rodar más burbujas sobre el chip para facilitar la inserción de nanoporos en las bicapas. Estas técnicas se pueden realizar con o sin cubetas de lectura. En algunos casos se puede aplicar un estímulo adicional para inducir la creación de bicapas o poros, incluyendo impulsos compresivos, ultrasónicos y sónicos.

En un aspecto, un procedimiento para formar una bicapa lipídica para su uso en un sensor con nanoporos comprende: (a) dirigir una solución amortiguadora en el canal de flujo que comprende un electrodo que tiene una capa de material sobre el mismo. La solución amortiguadora puede ser eléctricamente conductora, y la capa de material puede comprender uno o más lípidos. El procedimiento puede comprender poner la solución amortiguadora en contacto con la capa de material, y aplicar una o más tensiones a los electrodos y medir una corriente a través de los electrodos para determinar si al menos una parte de la capa de material ha cubierto y sellado los electrodos y/o ha formado una bicapa sobre la totalidad o una parte del electrodo. La tensión aplicada puede ser suficiente para romper el sellado de la bicapa sobre el electrodo y cortocircuitar el flujo de corriente. Basándose en una determinación de si al menos una parte de la capa de material ha cubierto y sellado los electrodos y/o ha formado una bicapa sobre la totalidad o una parte del electrodo, se puede aplicar un estímulo simultáneo a todos los electrodos, grupos de electrodos o electrodos individuales para inducir que al menos una parte de la capa de material forme la bicapa lipídica contigua al electrodo.

En algunos modos de realización, el estímulo comprende al menos uno de un flujo de líquido sobre la superficie de la matriz de electrodos, el flujo secuencial de uno o más líquidos diferentes sobre la superficie de la matriz, el flujo secuencial de cualquier combinación de uno o más líquidos diferentes y burbujas sobre la superficie de la matriz, un impulso eléctrico, impulso ultrasónico, impulso compresivo o impulso sónico. En algunos casos, la capa de material comprende al menos dos tipos de lípidos.

En algunos casos, la capa de material comprende una proteína del poro. En algunos casos, la proteína del poro es porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA) y/o hemolisina α o un derivado de la misma con al menos un 70 % de homología con su secuencia de aminoácidos. En algunos casos, la capa de material que comprende una o más proteínas porínicas incluye uno o más tensioactivos a una concentración inferior a la concentración micelar crítica del tensioactivo.

En algunos casos, el estímulo comprende al menos uno de un flujo de líquido sobre la superficie de la matriz de electrodos, el flujo secuencial de uno o más líquidos diferentes sobre la superficie de la matriz, el flujo secuencial de cualquier combinación de uno o más líquidos diferentes y burbujas sobre la superficie de la matriz, un impulso eléctrico, impulso ultrasónico, impulso compresivo o impulso sónico.

En un aspecto se describe un procedimiento automatizado para crear una bicapa lipídica en la parte superior de cada uno de los múltiples electrodos que forman una matriz de electrodos controlados individualmente y un procedimiento para insertar un solo poro en cada bicapa encima de cada electrodo en una matriz de electrodos controlados individualmente en un sensor semiconductor. Al aplicar un estímulo externo apropiado (por ejemplo, estímulo eléctrico, estímulo compresivo, ultrasónico o sónico) a una capa lipídica en estrecha proximidad a un electrodo en una superficie esencialmente plana, se puede inducir la formación de una bicapa sobre el electrodo en una matriz de electrodos. Además, al aplicar un estímulo externo apropiado (por ejemplo, incluyendo estímulo eléctrico, estímulo compresivo, ultrasónico o sónico) a un electrodo individual, a todo el chip sensor que tiene bicapas lipídicas en uno o más

electrodos y que están cubiertos por una solución que contiene proteínas de nanoporo, se puede inducir la inserción de un poro en la bicapa. El resultado es que se crea automáticamente una bicapa, sin intervención manual, sobre múltiples electrodos en una matriz de electrodos controlados individualmente en respuesta a un estímulo y de una manera determinista. En algunos casos se puede insertar un solo nanoporo en múltiples electrodos/bicapas en respuesta a un estímulo y de manera determinista y, por lo tanto, crear una matriz altamente paralela de sensores eléctricos con nanoporos controlados individualmente. Estas matrices de sensores con nanoporos controlados individualmente se pueden crear en una superficie semiconductora esencialmente plana y, dentro del material semiconductor, se crea una parte o la totalidad de los circuitos necesarios para hacer funcionar y controlar los electrodos individuales.

Además de las formas anteriores de crear bicapas y poros, en esta solicitud se describen procedimientos para crear bicapas y poros en matrices de sensores eléctricos/con nanoporos controlados individualmente que son rentables y sencillos e incluyen: 1) activar mezclas de proteínas lipídicas o lipídicas-porínicas ya en el sensor (aplicadas previamente) y provocar la creación espontánea de bicapas o de bicapas-poros, 2) activar mezclas de proteínas lipídicas o lipídicas-porínicas ya en el sensor (aplicadas previamente) y crear directamente bicapas y/o poros por medio de estimulación eléctrica en los electrodos o estimulación del sistema para crear bicapas y/o poros, 3) activar mezclas de proteínas lipídicas o lipídicas-porínicas ya en el sensor (aplicadas previamente) y crear directamente bicapas y/o poros por medio del contacto de una burbuja con la superficie de un chip sensor o haciendo pasar una burbuja por la misma, 4) activar mezclas de proteínas lipídicas o lipídicas-porínicas ya en el sensor (aplicadas previamente) y distribuir y diluir la mezcla en la superficie de una matriz de sensores utilizando una burbuja que prepara la superficie para la posterior estimulación eléctrica en los electrodos o la estimulación del sistema para crear bicapas y/o poros, 5) un procedimiento de burbujas que aplica, distribuye y diluye una mezcla lipídica en la superficie de una matriz de sensores para crear bicapas sobre múltiples electrodos independientes en una matriz, 6) un procedimiento de burbujas que aplica, distribuye y diluye una mezcla lipídica y, por lo tanto, prepara la superficie para la posterior estimulación eléctrica en los electrodos o estimulación del sistema para crear bicapas sobre múltiples electrodos, 7) un procedimiento de burbujas que aplica, distribuye y diluye una mezcla de proteínas porínicas en la superficie de una matriz de sensores preparada con una mezcla lipídica para que se inserten poros sobre múltiples electrodos independientes en una matriz, 8) un procedimiento de burbujas que aplica, distribuye y diluye una mezcla de proteínas porínicas y, por lo tanto, prepara la superficie para la posterior estimulación eléctrica en los electrodos o estimulación del sistema para crear un solo poro sobre múltiples electrodos en una matriz, 9) un procedimiento que describe el uso de un estímulo eléctrico para crear una bicapa sobre la superficie de un electrodo que no requiere la generación de una burbuja sobre la superficie de un electrodo, 10) procedimientos que describen la "estimulación del sistema" mencionada anteriormente que comprenden el uso de un estímulo ultrasónico o compresivo aplicado a uno o más electrodos, o al chip sensor completo, para crear una bicapa y/o un poro sobre la superficie de un electrodo o múltiples electrodos, 11) un procedimiento para aumentar la densidad de electrodos en una matriz semiconductor de electrodos para la detección eléctrica de nanoporos que es compatible con los procedimientos para establecer bicapas y poros descritos anteriormente, 12) procedimientos que muestran que ninguna cubeta de lectura ni un solo chip sensor abierto que contiene una matriz de múltiples sensores con electrodos-nanoporos pueden permitir los procedimientos identificados, ni una sola cubeta de lectura en un solo chip sensor que contiene una matriz de múltiples sensores con electrodos-nanoporos puede permitir los procedimientos identificados anteriormente, o que múltiples cubetas de lectura en un solo chip sensor que contiene una matriz de múltiples sensores con electrodos-nanoporos pueden permitir los procedimientos identificados, 13) la presión del líquido o burbuja se puede variar para mejorar la creación eficaz de bicapas o poros, y 14) la temperatura del chip sensor y del líquido se pueden variar para mejorar la creación de bicapas o poros.

Hay múltiples formas de crear una bicapa lipídica e insertar el poro en la bicapa. En un modo de realización se presenta un chip semiconductor con múltiples electrodos. Se aplica una solución lipídica líquida a la superficie preparada silanizada del chip. La solución lipídica líquida puede ser una solución de decano y moléculas lipídicas, tal como la difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC). La solución se puede aplicar sobre la superficie mediante vertido, rociado, enjugador. La solución se seca sobre la superficie. La solución se puede secar completamente de modo que solo quede la forma en polvo de las moléculas de DPhPC. O la solución se puede secar hasta un estado pegajoso. Por tanto, la superficie del chip se vuelve funcional por las moléculas lipídicas aplicadas previamente en forma de polvo o en forma de solución pegajosa. El chip se sella y se puede manipular y transportar.

El chip semiconductor puede contener una cubierta y la cubierta le permite al usuario bombear líquido dentro y fuera a través del chip. El usuario aplica un líquido amortiguador, tal como agua salada, en el chip para activar las moléculas lipídicas. Una vez que las moléculas lipídicas secas entran en contacto con la solución amortiguadora, las moléculas lipídicas se hidratan. La presión del líquido amortiguador entrante puede facilitar la formación espontánea de una bicapa lipídica sobre la superficie de cada electrodo.

En todas las técnicas descritas en el presente documento, el chip semiconductor puede no contener una cubierta y el usuario aplica un líquido amortiguador, tal como agua salada, sobre la superficie del chip utilizando una pipeta u otro instrumento para activar las moléculas lipídicas. Una vez que las moléculas lipídicas secas entran en contacto con la solución amortiguadora, las moléculas lipídicas se hidratan. La presión del líquido amortiguador entrante puede facilitar la formación espontánea de una bicapa lipídica sobre la superficie de cada electrodo.

5 En otro modo de realización relacionado donde el chip semiconductor contiene una cubierta, después de aplicar el líquido amortiguador al chip, se bombea una burbuja dentro y detrás de la burbuja hay más solución amortiguadora. La burbuja barre el chip y alisa y diluye la mezcla lipídica depositada previamente y recién hidratada, y hace que las moléculas lipídicas barran la superficie. Después del flujo de la burbuja a través del chip, se puede formar una bicapa lipídica sobre la superficie de cada electrodo.

10 En aún otro modo de realización relacionado, después de aplicar la burbuja que barre el chip, se aplica una señal eléctrica al (a los) electrodo(s) y el estímulo eléctrico puede hacer que se formen bicapas en el (los) electrodo(s). El estímulo eléctrico con un potencial de tensión puede alterar la interfaz entre la superficie del electrodo y el material lipídico alrededor de los electrodos para provocar la formación brusca y rápida de bicapas.

15 En otro modo de realización, la solución lipídica líquida puede contener además proteínas del poro, tales como porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA) o hemolisina α . La solución que contiene moléculas lipídicas y proteínas del poro se seca. La superficie del chip se prepara con moléculas de silano para que la superficie se vuelva hidrófoba. Las moléculas lipídicas y las proteínas del poro se depositan en forma de polvo o en estado pegajoso. El usuario puede activar el chip aplicando una solución amortiguadora al chip. Las moléculas lipídicas y las proteínas del poro se hidratan. Se puede formar espontáneamente una capa lipídica con nanoporo insertado sobre cada electrodo.

20 En otro modo de realización relacionado, después de aplicar el líquido amortiguador al chip, se bombea una burbuja dentro y detrás de la burbuja hay más solución amortiguadora. La burbuja barre el chip y alisa y diluye la mezcla lipídica con poros depositada previamente y recién hidratada, y hace que las moléculas lipídicas y/o del poro barran la superficie. Después del flujo de la burbuja a través del chip, se puede formar una bicapa lipídica sobre la superficie de cada electrodo y también se insertan proteínas del poro en la bicapa como nanoporos.

25 En aún otro modo de realización relacionado, después de aplicar la burbuja que barre el chip, se aplica una señal eléctrica al electrodo y el estímulo eléctrico puede hacer que se formen bicapas en el electrodo y que se inserten nanoporos en la bicapa. El estímulo eléctrico con un potencial de tensión puede alterar la superficie del electrodo y afecta al material lipídico alrededor de los electrodos para provocar la formación brusca y rápida de bicapas y nanoporos en las bicapas.

30 En otro modo de realización, el chip semiconductor está solo silanizado y no tiene ninguna molécula aplicada previamente, tales como moléculas lipídicas o proteínas del poro, que vuelva funcional la superficie del chip. El usuario primero enjuaga la superficie del chip con agua salada. A continuación, se inserta una alícuota de lípido y decano en el chip. Lo sigue una burbuja para extender el material lipídico y distribuirlo y diluirlo sobre la superficie del chip. Se crean espontáneamente bicapas lipídicas sobre múltiples electrodos por medio del contacto y la distribución de la burbuja.

35 En otro modo de realización relacionado, las bicapas lipídicas no se pueden crear espontáneamente después de la burbuja. Se aplica a los electrodos una estimulación eléctrica posterior. El impulso eléctrico hace que se formen las bicapas en los electrodos.

40 En otro modo de realización relacionado, después de que la burbuja barre el chip y se distribuye el material lipídico, la sigue un flujo de agua salada. Después del agua salada se inserta en el chip una solución de proteína del poro. La sigue otra burbuja para extender y diluir la mezcla de proteínas del poro en la superficie del chip para que los poros se inserten sobre los múltiples electrodos independientes en una matriz por medio de una forma de contacto o presión de la burbuja.

45 En aún otro modo de realización relacionado, después de insertar la solución de proteína del poro y la segunda burbuja, se aplica una estimulación eléctrica posterior en los electrodos para crear nanoporos en las bicapas lipídicas sobre los múltiples electrodos de una matriz.

50 En otro modo de realización, se inserta una alícuota de lípido y decano en el chip lleno o cubierto de una solución iónica (tal como agua salada). Se aplica a los electrodos una estimulación eléctrica posterior. El impulso eléctrico hace que se formen las bicapas en los electrodos. En este modo de realización, no se inserta una burbuja para facilitar la formación de bicapas. El lípido se distribuye bien alrededor de los electrodos sobre la superficie del chip. Una tensión aplicada en los electrodos provoca la alteración del material lipídico en el borde de los electrodos e induce la formación de una bicapa lipídica.

55 El chip sensor semiconductor con nanoporos puede contener uno o más canales a través de los que pueden fluir líquidos y reactivos. En un modo de realización, cada canal tiene dos carriles, uno a cada lado del canal. Los electrodos pueden estar en la superficie inferior del canal. Los electrodos también pueden estar en la superficie de la pared lateral del canal (en los carriles). Por tanto, la densidad de electrodos para cada canal se puede aumentar creando electrodos en las superficies inferior y lateral.

60 En un modo de realización, se pueden utilizar una o más cubetas de lectura en el chip semiconductor. Cada cubeta de lectura se puede usar para insertar soluciones y burbujas en uno de los canales del chip. Una cubeta de lectura es

una vía por el que pueden pasar líquidos, burbujas y reactivos. Los canales del chip que actúan como una cubeta de lectura completa o partes de la misma pueden ser independientes, de modo que el chip puede procesar múltiples muestras diferentes de forma independiente y simultánea.

5 En un modo de realización, no hay canal ni cubeta de lectura en el chip. Se aplica previamente al chip una solución lipídica líquida o una solución líquida de mezcla lipídica/del poro. La solución se seca hasta polvo o a un estado pegajoso. Se aplica una solución amortiguadora líquida al chip para activar el lípido o la mezcla lipídica/del poro. Se aplica una señal eléctrica al electrodo y el estímulo eléctrico puede hacer que se formen bicapas en el electrodo. El estímulo eléctrico con un potencial de tensión puede alterar la superficie del electrodo y afecta al material lipídico
10 alrededor de los electrodos para provocar la formación brusca y rápida de bicapas. Además, si está presente una proteína del poro activada, el estímulo eléctrico puede facilitar aún más la inserción de moléculas del poro en las bicapas lipídicas.

15 En algunos modos de realización se puede variar la presión del líquido o burbuja para mejorar la creación de bicapas o nanoporos. En algunos modos de realización se pueden variar la temperatura del chip y del líquido para mejorar la creación de bicapas o poros. Por ejemplo, se puede aplicar un poco más de frío que la temperatura ambiente cuando se forma la bicapa; se puede aplicar un poco más de calor que la temperatura ambiente cuando se inserta el nanoporo en la bicapa lipídica.

20 En un modo de realización se puede dejar abierto y accesible uno de los cuatro lados del chip sellado. El lado opuesto también puede tener un único orificio con el que puede entrar en contacto y conectarse un tubo. Si el chip se levanta para que quede vertical con el orificio y el tubo en la parte inferior y el extremo abierto del chip en la parte superior, se puede agregar líquido amortiguador y reactivos a través de la parte superior y a continuación se pueden liberar burbujas, a un ritmo controlado, desde la parte inferior para que suban por la cavidad sellada y fluyan a través del
25 chip. Es posible que en este sistema no rueden a través del chip trenes de burbujas que separan fracciones líquidas. Suaviza cualquier sustancia que se agregue a través de la parte superior abierta del chip empaquetado y descienda por la superficie interior del chip. A la inversa, es posible insertar líquidos y reactivos a través del único tubo en la parte inferior del aparato y esto puede ser ventajoso cuando se puedan requerir adiciones automáticas de reactivos seriadas en el tiempo.

30 En todas las técnicas descritas en el presente documento, es posible acoplar los chips sensores a un aparato, o colocarlos en el mismo, que aplicará de manera automática cualquier combinación de líquidos, reactivos, burbujas, impulsos de estímulo eléctrico, presión o impulsos compresivos, temperatura o impulsos térmicos, impulsos ultrasónicos y/o impulsos sónicos al chip sensor para provocar la creación automática de bicapas, creación de poros,
35 mantenimiento de bicapas y poros, incluyendo su nueva creación, captura y lectura de las moléculas biológicas aplicadas al chip sensor del nanoporo, y proporcionar datos en tiempo real y/o finales del estado de todos los sensores y todas las características de rendimiento del instrumento. El aparato puede permitir cualquier nivel de intervención manual del operario o permitir la creación de pruebas personalizadas. El aparato puede aplicar diferentes señales y/o reactivos o actuar sobre la muestra o el chip en respuesta al resultado de una señal de prueba anterior o adición de
40 reactivo, lo que permite que el aparato funcione de forma totalmente automática. Dicho sistema puede permitir la realización sin operario de experimentos de evolución temporal o permitir la restauración del sistema de nanoporos para volver funcional de nuevo la superficie del chip sensor para continuar realizando pruebas.

45 En todas las técnicas descritas en el presente documento, la aplicación de un estímulo para inducir la creación de bicapas o la creación de poros también puede incluir la aplicación de presión, temperatura, ultrasonidos o sonido al chip para estimular los acontecimientos deseados de creación de bicapas/poros.

50 En todas las técnicas descritas en el presente documento, el chip semiconductor puede no contener una cubierta y el usuario aplica todos y cada uno de los amortiguadores, reactivos y burbujas manualmente a través del uso de una pipeta u otro instrumento. Esta aplicación manual de estas técnicas se puede acoplar a cualquier estímulo aplicado descrito en el presente documento para inducir la formación deseada de bicapas y/o poros.

55 La cubeta de lectura o un sencillo sistema de burbujas también pueden ayudar en gran medida a la inserción de poros al aplicar la solución de proteínas del poro de manera uniforme alrededor de la superficie del chip sensor y provocar la inserción espontánea de poros o la configuración de la superficie de modo que el estímulo eléctrico fomente la inserción rápida de poros en las bicapas. Una cubeta de lectura o un sencillo sistema de burbujas también pueden ayudar a hidratar una mezcla seca de lípidos-proteínas del poro que puede formar tanto bicapas como poros espontáneos después de homogeneizar o incorporar un amortiguador apropiado con o sin burbujas.

60 La **figura 7** ilustra un procedimiento de muestra para formar una capa lipídica sobre los electrodos en uno o más canales de flujo de un chip sensor. El chip sensor puede ser un chip plano que contiene múltiples electrodos incluidos en una superficie no conductora o semiconductor, esencialmente enrasados con la misma, que está situada en la superficie de los canales de flujo. El procedimiento comprende las etapas de **701** hacer fluir una solución lipídica que comprende al menos un tipo de lípidos a través de cada uno de los canales de flujo; **702** depositar los lípidos en la
65 superficie de los electrodos; **703** suavizar y diluir los lípidos depositados con una burbuja de seguimiento en cada uno de los canales de flujo; **704** llenar cada uno de los canales de flujo con una solución amortiguadora, siendo la solución

amortiguadora eléctricamente conductora; **705** medir corrientes a través de los electrodos para determinar si se forma una bicapa lipídica sobre cada uno de los electrodos; y **706** si todavía no se forman las bicapas lipídicas en ninguno de los electrodos, aplicar un estímulo (por ejemplo, un estímulo eléctrico) para inducir que los lípidos de las superficies formen bicapas lipídicas sobre los electrodos. En algunos casos se aplica una tensión para probar las bicapas y a continuación para insertar poros. En algunos casos, sin embargo, no se aplica tensión para crear bicapas.

En algunos modos de realización, la solución lipídica puede comprender al menos dos tipos de lípidos. La solución lipídica puede comprender además al menos un tipo de proteínas del poro. Las proteínas del poro pueden comprender porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA) o hemolisina α . El procedimiento puede comprender además la etapa de hacer fluir una solución no lipídica que contiene proteínas del poro sobre los lípidos depositados en cada uno de los canales de flujo; diluir las proteínas del poro y los lípidos depositados con una segunda burbuja en cada uno de los canales de flujo. El procedimiento puede comprender además hacer fluir una solución de proteínas del poro, una burbuja de aire adicional y una solución líquida adicional a través del canal de flujo, estando separadas la solución de proteínas del poro y la solución líquida por la burbuja de aire; y aplicar un estímulo eléctrico a través de al menos algunos de los electrodos para facilitar la inserción de la proteína del poro en la bicapa lipídica. Todas las etapas de flujo de soluciones y burbujas se pueden repetir en cualquier orden y combinación para lograr la formación de la bicapa lipídica y la inserción de nanoporos en la bicapa. El lípido puede ser difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), dioleoilfosfatidilmetiléster (DOPME), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol o esfingomielina. La solución lipídica líquida puede contener además un disolvente orgánico tal como el decano.

En algún modo de realización, la solución amortiguadora puede contener solución iónica, tal como solución de cloruro de sodio o cloruro de potasio. La solución amortiguadora puede contener además cianuro ferroso o ácido ascórbico. En algunos modos de realización, la presión de las burbujas se ajusta sustancialmente a la presión atmosférica o ligeramente por encima de ella para mejorar la formación de bicapa o la inserción de nanoporos.

La **figura 8** ilustra una muestra de chip sensor semiconductor, de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación. El chip sensor **800** comprende múltiples canales de flujo **810**. Cada canal de flujo tiene múltiples electrodos **820** incluidos en una superficie no conductora o semiconductor, esencialmente enrasados con la misma, que está situada en la superficie de los canales de flujo **810**. La superficie de los electrodos está silanizada para que sea hidrófila. La superficie del canal de flujo, salvo los electrodos, es hidrófoba. Los canales de flujo **810** están separados por carriles de guía **840** a lo largo de los canales de flujo. La anchura del canal puede ser lo suficientemente ancha para dar cabida a dos o más filas de electrodos. Los electrodos se pueden construir en la superficie inferior de los canales de flujo, así como en las paredes laterales de los carriles de guía, como se muestra en la **figura 8**. En algún modo de realización, el lado superior de los canales de flujo puede estar sellado.

En un aspecto, un procedimiento para formar una bicapa lipídica sobre los electrodos en uno o más canales de flujo de un chip sensor comprende: (a) hacer fluir una solución lipídica que comprende al menos un tipo de lípidos a través de cada uno de los canales de flujo; (b) depositar los lípidos en la superficie de los electrodos; (c) suavizar y diluir los lípidos depositados con una burbuja de seguimiento en cada uno de los canales de flujo; (d) llenar cada uno de los canales de flujo con una solución amortiguadora, siendo la solución amortiguadora eléctricamente conductora; (e) medir corrientes a través de los electrodos para determinar si se forma una bicapa lipídica sobre cada uno de los electrodos; y (f) si todavía no se forman las bicapas lipídicas en ninguno de los electrodos, aplicar un estímulo al menos a uno de los electrodos para inducir que los lípidos de las superficies formen bicapas lipídicas sobre los electrodos. El estímulo puede comprender al menos uno de impulso eléctrico, impulso ultrasónico, impulso compresivo o impulso sónico.

En algunos modos de realización, la solución lipídica comprende al menos dos tipos de lípidos. En algunos modos de realización, la solución lipídica comprende además al menos un tipo de proteínas del poro.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además, después de (c): (c1) hacer fluir una solución no lipídica que contiene proteínas del poro sobre los lípidos depositados en cada uno de los canales de flujo; y (c2) diluir las proteínas del poro y los lípidos depositados con una segunda burbuja en cada uno de los canales de flujo. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además, después de (c2): (c3) repetir las etapas (b), (c), (c1) o (c2) en cualquier orden o combinación.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además: (g) hacer fluir una solución de proteínas del poro, una burbuja de aire adicional y una solución líquida adicional a través del canal de flujo, estando separadas la solución de proteínas del poro y la solución líquida por la burbuja de aire. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además: (h) aplicar un estímulo eléctrico a través de al menos algunos de los electrodos para facilitar la inserción de la proteína del poro en la bicapa lipídica.

En algunos modos de realización, el lípido es difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), dioleoilfosfatidilmetiléster (DOPME), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol o esfingomielina.

En algunos casos, al menos algunas de las soluciones lipídicas líquidas contienen un disolvente orgánico (por ejemplo, decano). Las proteínas del poro pueden comprender porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA) o hemolisina α . En algunos casos, la solución amortiguadora contiene una solución iónica (por ejemplo, cloruro de sodio o cloruro de potasio). En algunos casos, al menos parte de la solución amortiguadora contiene cianuro ferroso o ácido ascórbico.

5 En algunos modos de realización, la presión de las burbujas está sustancialmente a la presión atmosférica o ligeramente por encima de ella. En algunos casos, la superficie de los electrodos es hidrófila. En algunos casos, la superficie del canal de flujo, salvo los electrodos, es hidrófoba.

10 En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además, antes de (a), uno o más de: (a1) hacer que la superficie del canal de flujo, salvo los electrodos, sea hidrófoba silanizando la superficie del canal de flujo, salvo los electrodos; (a2) formar una pluralidad de canales de flujo en una superficie del chip; (a3) construir los electrodos en una superficie de cada uno de los canales de flujo; (a4) separar los canales de flujo construyendo carriles de guía a lo largo de los canales de flujo; (a5) construir los electrodos en una superficie lateral de cada uno de los carriles de
15 guía; y (a6) sellar el lado superior de cada uno de los canales de flujo.

Un procedimiento para crear un chip que tenga una bicapa es hacer fluir una solución iónica a través del chip. En algunos casos, el flujo es un "tren" de alícuotas de solución lipídica y solución iónica intercaladas (por ejemplo, solución lipídica y solución iónica alternadas). El flujo puede pasar a través del tubo de suministro y a través del chip. El tren puede tener aproximadamente 5 μ l de lípido y a continuación 5 μ l de solución iónica, y se puede repetir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces. El tren de soluciones se puede bombear hacia adelante y hacia atrás sobre la superficie del biochip aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces. La cobertura y/o el sellado se pueden verificar eléctricamente a continuación.

20 En algunos casos, al tren de soluciones va seguido de una etapa de ensamblaje. En algunos casos, la etapa de ensamblaje implica hacer fluir una burbuja a través del chip. En algunos casos, la cobertura de las celdas (electrodos), las fugas o la resistencia de sellado en cada electrodo y la tensión aplicada en los sellos y/o bicapas se pueden verificar eléctricamente.

30 En algunos casos, la operación de ensamblaje se repite hasta obtener aproximadamente los siguientes resultados de prueba: (1) aproximadamente 190 o más electrodos están cubiertos; (2) al menos aproximadamente 120 membranas (por ejemplo, capas lipídicas) saltan a una tensión aplicada de menos de -1 V; (3) de las capas lipídicas que saltaron en (2), 69 o más han saltado entre aproximadamente -300 mV y -700 mV; (4) el número de electrodos con una resistencia de sellado inferior a aproximadamente 50 gigaohmios es inferior a 15; y (5) si el número de celdas que muestran cualquier corriente de fuga registrada supera 50, entonces la mediana de la resistencia de sellado es superior a 150 gigaohmios.

40 Si se cumplen algunos de estos criterios o todos ellos, entonces se puede hacer fluir una burbuja de aproximadamente 10 μ l a través del chip y se puede realizar una prueba final de (1), (4) y (5). Si se supera, entonces el programa pasa al protocolo de inserción de poros. El programa se puede implementar con la ayuda de un sistema informático (por ejemplo, tras su ejecución por un procesador), tal como, por ejemplo, el sistema informático **601** de la **FIG. 6**.

45 En algunos casos, el protocolo de inserción de poros incluye aplicar 5 μ l de solución de proteína del poro al chip y electroporar para insertar los poros en la bicapa. Al final de la operación de electroporación, se comprueba el chip para determinar el rendimiento de poros y, si se superan los criterios, se aplican reactivos de muestra y de prueba.

En algunos casos, el tiempo total para la inserción de bicapas y poros es, en promedio, de 15 minutos para la creación de bicapas y 20 minutos para la inserción de poros. un total de 35 minutos.

50 Con una membrana (por ejemplo, bicapa lipídica) se pueden cubrir incontables pocillos con un poro insertado (por ejemplo, rendimiento de poros). En algunos casos, el rendimiento de poros es de aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 % y similares. En algunos casos, el rendimiento de poros es al menos aproximadamente del 10 %, al menos aproximadamente del 20 %, al menos aproximadamente del 30 %, al menos aproximadamente del 40 %, al menos aproximadamente del 50 %, al menos aproximadamente del 60 %, al menos aproximadamente del 70 %, al menos aproximadamente del 80 %, al menos aproximadamente del 90 % y similares.

60 En algunos modos de realización, los parámetros aplicados al chip del electrodo y a una configuración de prueba son KCl 1 M, pH 7,5, caudales de fluidos actuales, presión atmosférica a nivel del mar y temperatura ambiente.

Sondas retenidas

65 En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para capturar, detectar, contar, clasificar, agrupar y enriquecer moléculas individuales (por ejemplo, proteínas) a partir de una mezcla heterogénea u homogénea.

Se han descrito técnicas para retener, detectar, clasificar, contar, aislar, recoger y/o agrupar moléculas individuales de una en una. En algunos modos de realización se utiliza para dichos fines una sonda molecular retenida en un nanoporo. En algunos modos de realización se utiliza para dichos fines un complejo de lectura por nanoporos (NRC) que incluye una sonda molecular. En algunos modos de realización, el NRC incluye una sonda molecular que un nanoporo puede capturar, retener, introducir a su través y/o leer. En algunos modos de realización, la sonda molecular ("sonda") incluye una o más de las siguientes partes: (1) una sección o secuencia de sonda que se puede unir a una molécula diana directamente o unir a una molécula indicadora que se une a una molécula diana; (2) caperuzas de temperatura variable (VTC) unidas a uno o más extremos de la sonda molecular, las caperuzas de temperatura variable son sensibles a la temperatura y pueden adoptar estructuras bidimensionales y/o tridimensionales voluminosas a ciertos intervalos de temperatura y una estructura lineal a otro intervalo de temperatura; (4) una o más secciones de verificación que un nanoporo puede leer para identificar el NRC, la sonda molecular incorporada en el NRC, la molécula diana unida directamente a la sonda molecular o por medio de una molécula indicadora, y/o el estado del NRC (por ejemplo, donde hay una molécula indicadora y/o una molécula diana unida al NRC); (5) una sección de unión al indicador para que se una a una molécula indicadora; (6) marcas de purificación para su posterior aislamiento o purificación; (7) sección de ID de dirección única; y/o (8) una o más secciones de "conmutadores de lectura" que cambian de estado/características al introducirse por el poro para indicar que el nanoporo ha leído la sonda (por ejemplo, se han introducido a través del nanoporo para la detección de señales eléctricas).

En un aspecto, un procedimiento para detectar una molécula diana comprende: (a) proporcionar un chip que comprende un nanoporo en una membrana que está dispuesta contigua o cerca de un electrodo de detección; (b) dirigir una molécula de ácido nucleico a través del nanoporo. La molécula de ácido nucleico puede estar asociada con una molécula indicadora. La molécula de ácido nucleico puede comprender una región de dirección y una región de sonda. La molécula indicadora puede estar asociada con la molécula de ácido nucleico en la región de sonda. La molécula indicadora se puede acoplar a una molécula diana. En algunos casos, el procedimiento comprende además (c) secuenciar la región de dirección, mientras la molécula de ácido nucleico se dirige a través del nanoporo para determinar una secuencia de ácido nucleico de la región de dirección; y (d) identificar, con la ayuda de un procesador informático, la molécula diana basada en una secuencia de ácido nucleico de la región de dirección determinada en (c).

En algunos modos de realización, la sonda molecular en (b) queda detenida y retenida en el poro por la unión de la molécula indicadora a la región de sonda de la molécula en (b) (y la velocidad de progresión de la sonda a través del nanoporo se puede ver reducida basándose en la asociación de la molécula indicadora con la molécula de ácido nucleico).

En algunos casos se identifican hasta 3, 4 o 5 bases de la molécula de ácido nucleico cuando se reduce la velocidad de progresión de la molécula de ácido nucleico a través del nanoporo. En algunos casos, el indicador unido detiene completamente la molécula que está en el poro. El complejo hibridado puede comprender la sonda molecular en el poro y el indicador unido a la sonda molecular. La lectura se puede lograr mediante la adición de badenes.

En algunos casos, sin que los extremos de la sonda hayan formado estructuras voluminosas, la sonda forma una estructura voluminosa en un extremo, por lo que la sonda permanecerá en el poro.

En algunos modos de realización, el NRC también incluye una molécula indicadora ("indicador") que se une a la sonda molecular. La molécula indicadora puede ser (a) cualquier molécula que se pueda unir a un solo polímero, incluyendo péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, ADN, ARN, ARNip, ARNhc, ácidos peptidonucleicos, ácidos glicolnucleicos, ácidos nucleicos metilados y/o no metilados, etc., y/o (b) cualquier molécula que se pueda unir a un polímero policatenario, incluyendo las hebras de péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros polímeros biológicos y químicos. En algunos modos de realización, la molécula indicadora se puede hacer singular para una fuente determinada de una molécula diana (por ejemplo, de una muestra determinada) y la identificación de la molécula indicadora se puede usar para identificar la fuente de la molécula diana. En algunos modos de realización, la molécula indicadora se puede capturar y unir a una sonda molecular, y contarla, clasificarla, recogerla y/o agruparla utilizando las técnicas descritas en el presente documento.

En algunos modos de realización, el complejo de lectura por nanoporos (NRC) permite que la sonda o la sonda-NRC se inserten en un poro de forma unidireccional. En algunos modos de realización, el NRC forma una estructura voluminosa en un extremo y permanece en su forma lineal en el otro extremo bajo ciertas condiciones. Dado que la estructura voluminosa formada es demasiado grande para que se introduzca a través del nanoporo del detector de nanoporo (por ejemplo, intervalo de temperatura), el NRC solo se puede capturar e introducir a través de un nanoporo desde el extremo lineal del NRC, lo que da como resultado una lectura direccional del NRC por el nanoporo. En algunos modos de realización, la introducción y la lectura direccionales (por ejemplo, desde el extremo 5' del NRC) pueden proporcionar señales de lectura más limpias del NRC en nanoporo.

En algunos modos de realización, el NRC queda retenido en un nanoporo de un detector de nanoporo, y en consecuencia retiene la sonda incluida en el NRC en el nanoporo. En algunos modos de realización, la retención de la sonda molecular en el nanoporo permite que la misma sonda molecular se use repetidamente para capturar, detectar, caracterizar, clasificar, recoger y/o agrupar moléculas de muestras.

En algunos modos de realización, es posible verificar si un NRC y una sonda incluida en el NRC se insertan correctamente en un nanoporo. En algunos modos de realización, el NRC puede incluir un identificador de extremo anterior (por ejemplo, una secuencia única presente en el extremo anterior que se puede leer cuando el NRC se introduce por el extremo anterior para ofrecer un nivel de señal distinguible) que identifica el extremo anterior correcto y/o un identificador de extremo posterior (por ejemplo, una secuencia única presente en el extremo posterior que se puede leer cuando el NRC se introduce por el extremo posterior para ofrecer un nivel de señal distinguible) que identifica el extremo posterior correcto. Cuando se inserta el NRC en un nanoporo de un detector de nanoporo, el NRC se puede introducir por su extremo posterior y el detector de nanoporo lee la secuencia del extremo posterior. Si la secuencia leída coincide con la señal del extremo posterior correcto, confirma que el NRC se ha insertado correctamente (por ejemplo, se insertó desde el extremo 5') y que la caperuza terminal posterior (por ejemplo, la estructura de la horquilla del extremo posterior) se ha formado correctamente. Cuando el NRC retenido en el nanoporo se introduce por su extremo anterior y el detector de nanoporo lee la secuencia del extremo anterior, si la secuencia leída coincide con la señal del extremo anterior correcto, confirma que el NRC se ha insertado correctamente y que la caperuza terminal anterior (por ejemplo, la estructura de la horquilla del extremo anterior) se ha formado correctamente. Si se muestra que el NRC se ha insertado correctamente y las caperuzas terminales se han formado correctamente, la sonda (incluida en el NRC) retenida en el nanoporo está lista para su uso.

En algunos modos de realización, el NRC puede incluir la sección de "conmutador de lectura" que se puede usar para determinar si la sonda molecular se ha leído una vez. En algunos modos de realización, las características y/o propiedades del conmutador de lectura se modifican una vez que la sonda se ha leído una vez. En algunos modos de realización, una o más moléculas o fragmentos moleculares están unidos a una sonda molecular para servir de conmutador de lectura molecular. La molécula o los fragmentos moleculares se desprenden de la sonda molecular una vez que la sonda pasa a través del nanoporo. Por tanto, la presencia del conmutador de lectura molecular indica que la sonda no se ha leído (ya que la sonda molecular no se ha introducido a través del nanoporo para hacer que el conmutador de lectura cambie de estado), la ausencia del conmutador molecular indica que la sonda molecular se ha leído (ya que la sonda se ha introducido a través del nanoporo para hacer que el conmutador de lectura cambie de estado). El conmutador de lectura permite el análisis cuantitativo de las sondas moleculares y, en consecuencia, de las moléculas indicadoras y/o las moléculas de muestra unidas a las sondas moleculares en una muestra. En algunos modos de realización, uno o más tipos de sondas moleculares se incuban con moléculas de muestra para formar complejos de sonda-molécula de muestra. Los complejos de sonda-molécula de muestra se pueden colocar en una sola matriz de detectores de nanoporo para su análisis. Cada nanoporo puede captar un complejo de sonda-molécula de muestra y leerlo para determinar qué tipo de sonda-molécula de muestra/sonda/muestra se ha capturado. Una vez que se ha leído el complejo de sonda-molécula de muestra, el conmutador de lectura cambia de estado (por ejemplo, la molécula conmutadora se desprende de la sonda). El complejo de sonda-molécula de muestra leído se libera de nuevo al amortiguador que rodea el nanoporo. El nanoporo capta a continuación otra sonda-molécula de muestra y la lee de nuevo. Si la sonda-molécula de muestra se ha leído antes, no se detectará el conmutador de lectura. Si la sonda-molécula de muestra no se ha leído antes, se detectará el conmutador de lectura. Las sondas-moléculas de muestra que se han leído antes se pueden identificar y no contarlas, por lo que no se producirá un recuento doble de la sonda-muestra. De esta manera, se puede contar con exactitud un tipo determinado de sondas-moléculas de muestra y moléculas de muestra.

En algunos modos de realización, es posible determinar si la molécula correcta (por ejemplo, la molécula de muestra o la molécula indicadora correcta) se ha unido a la sonda correctamente. En algunos modos de realización, dado que una molécula determinada se unirá a una región específica en una sonda molecular. Cuando un detector de nanoporo lee la sonda-molécula, se estancará en una posición donde la molécula está unida a la sonda. La señal eléctrica que se lee cuando la molécula está estancada corresponde a la estructura/secuencia de la sección de la sonda por delante del sitio de unión de la molécula en la sonda. Se puede usar para identificar la estructura/secuencia de la sección de la sonda por delante del sitio de unión de la molécula en la sonda. Si la estructura/secuencia de la sonda por delante del sitio de unión de la molécula es única y da una señal eléctrica distinguible, la señal eléctrica se puede usar para identificar la molécula y determinar si se ha unido a la sonda la molécula correcta.

En algunos modos de realización, es posible identificar qué muestra origina una molécula, incluso si la molécula está en una muestra que contiene moléculas de diferentes muestras. En algunos modos de realización, las moléculas de muestra se unen a sondas moleculares por medio de moléculas intermediarias (por ejemplo, moléculas indicadoras), cada tipo de molécula se une a un tipo único de molécula intermediaria, cada tipo de molécula intermediaria se une a una ubicación única en una sonda molecular. Si se permite que las moléculas de muestra de una primera muestra se unan a un primer tipo de moléculas intermediarias, y se permite que las moléculas de muestra de una segunda muestra se unan a un segundo tipo de moléculas intermediarias, se puede determinar el origen de una molécula en una mezcla que contenga moléculas de la primera y la segunda muestras determinando la identidad de la molécula intermediaria unida a la molécula. En algunos modos de realización, la identidad de una molécula intermediaria (por ejemplo, una molécula indicadora) se puede determinar a partir de la señal generada cuando la molécula intermediaria está unida a una sonda molecular y se lee la secuencia anterior a la ubicación de unión de la molécula intermediaria en la sonda.

En algunos modos de realización se pueden determinar con exactitud los recuentos o concentraciones relativos de un tipo determinado de molécula de diferentes muestras. Por ejemplo, si un primer tipo de moléculas intermediarias de

unión a la deshidrogenasa se incubaba con una muestra de tejido sano, y un segundo tipo de moléculas intermediarias de unión a la deshidrogenasa se incubaba con una muestra de tejido enfermo. A continuación, las dos muestras se mezclan y analizan utilizando una sola matriz de detectores de nanoporo. En algunos modos de realización, las moléculas de deshidrogenasa de una muestra determinada se pueden contar, liberar y recoger selectivamente sin alterar la sonda molecular y/o el detector de nanoporo. En algunos modos de realización, la concentración relativa de las moléculas de deshidrogenasa de la muestra sana y de la muestra enferma se puede determinar con exactitud comparando las moléculas intermediarias de la muestra sana y la muestra enferma unidas a las sondas moleculares en la matriz de nanoporos.

En algunos modos de realización, una molécula del NRC incluye una o más marcas de aislamiento que ayudan a aislar la molécula del NRC y otras moléculas (por ejemplo, la molécula indicadora y de muestra) unidas a la molécula del NRC. En algunos modos de realización, las marcas de aislamiento se ven atraídas a fuentes magnéticas y se pueden usar para fijar las moléculas del NRC y otras moléculas unidas a las moléculas del NRC a una fuente magnética para aislar las moléculas del NRC y las demás moléculas unidas a las moléculas del NRC.

En algunos modos de realización, la sonda molecular se puede disociar de la molécula indicadora/de muestra sin dañar la sonda molecular. En algunos modos de realización, la temperatura se puede incrementar para disociar la molécula indicadora/molécula de muestra sin dañar la sonda molecular ni el nanoporo.

La **figura 9** ilustra un ejemplo de una sonda molecular retenida en un nanoporo. La sonda molecular incluye una secuencia de sonda para que se una a un indicador que se une a una molécula diana. La molécula diana puede ser cualquier molécula adecuada, tal como proteínas y péptidos, etc. La sonda molecular se retiene en el nanoporo utilizando estructuras voluminosas como caperuzas terminales. Las estructuras voluminosas pueden ser sensibles a la temperatura y se pueden formar y disociar dependiendo de la temperatura.

La **figura 10** ilustra una sonda molecular de ejemplo retenida en un nanoporo. En el ejemplo que se muestra, la sonda molecular incluye una secuencia de sonda para que se una a una molécula indicadora que se une a un ligando que se une a una molécula diana. El ligando es un anticuerpo que se une a la molécula diana. La molécula diana puede ser cualquier molécula adecuada, tal como proteínas, péptidos, bacterias o restos químicos, etc. La molécula indicadora es una secuencia polimérica monocatenaria. La sonda molecular se retiene en el nanoporo utilizando estructuras voluminosas como caperuzas terminales. Las estructuras voluminosas pueden ser sensibles a la temperatura y se forman y disocian dependiendo de la temperatura. Aunque no se ilustra, el ADN, el ARN u otras moléculas nucleotídicas diana se pueden unir directamente a la sonda molecular en la secuencia de sonda. La identidad del nucleótido diana se puede determinar basándose en las señales generadas cuando se lee la secuencia por delante de la sonda molecular, la secuencia de dirección, utilizando un nanoporo.

La **figura 11** ilustra una secuencia lineal de ejemplo de una sonda molecular. La sonda molecular incluye un extremo anterior (en el extremo 5') y un extremo posterior (en el extremo 3'). El extremo posterior incluye IJ. Como se ilustra en la **figura 12**, una hebra de antisentido se puede unir a J para formar una caperuzas bicatenaria que es lo suficientemente voluminosa como para que se excluya del nanoporo. De forma alternativa, J se puede plegar y unir sobre sí mismo en una conformación 2D o 3D para formar la caperuzas terminal posterior. El extremo anterior incluye ONML. O se pliega hacia atrás para que se una a M para formar una caperuzas que tiene una estructura de horquilla. La caperuzas bicatenaria se forma a una temperatura más alta que la caperuzas terminal anterior. La orientación de los extremos anterior y posterior del polímero se puede cambiar ajustando las temperaturas de fusión de la caperuzas. La caperuzas de alta temperatura de fusión se convierte en el extremo posterior y la de baja temperatura de fusión se convierte en el extremo anterior. El extremo anterior también incluye una secuencia identificadora terminal L que se puede usar para identificar el extremo anterior cuando el nanoporo la lee cuando se empuja la caperuzas de baja temperatura del extremo anterior contra el nanoporo. El extremo posterior incluye una secuencia identificadora terminal I que se puede usar para identificar el extremo posterior cuando el nanoporo la lee cuando se empuja la caperuzas de alta temperatura del extremo posterior contra el nanoporo.

La **figura 13** ilustra un flujo del procedimiento para retener y caracterizar una sonda molecular utilizando un nanoporo. En **502** se elabora la sonda molecular con la secuencia adecuada. En **504** se forma una caperuzas de alta temperatura en un extremo de la sonda, por ejemplo, reduciendo la temperatura por debajo de la temperatura de fusión de la estructura de la caperuzas de alta temperatura. En **506**, la sonda molecular se introduce a través del nanoporo desde el extremo anterior (extremo de la caperuzas de baja temperatura). En **508** se reduce la temperatura por debajo de la temperatura de fusión de la estructura de la caperuzas de baja temperatura para permitir que se forme la caperuzas de baja temperatura en el extremo anterior. En **508** se arrastra la sonda a un extremo (ya sea el extremo anterior o el posterior), se lee el identificador terminal. En **510** se arrastra la sonda al otro extremo y se lee el identificador terminal. En **512** se determina si se han leído los identificadores terminales correctos; si es así, se ha capturado la sonda en el nanoporo. En **514** se fijan badenes a una región de dirección de la sonda. En **516**, la sonda se introduce a través del nanoporo para empujar los cebadores fijados a la región de dirección de la sonda contra el nanoporo. La secuencia de sonda en la región de dirección se lee cuando cada cebador estanca la progresión de la sonda molecular. En **518**, se determina la identidad de la sonda molecular basándose en la secuencia de dirección leída de la sonda molecular.

La **figura 14** es un flujo del procedimiento para capturar e identificar, contar, clasificar y/o recoger moléculas diana

utilizando una sonda retenida en un nanoporo. En **602**, la molécula diana se une a una sonda conocida capturada en el nanoporo. La unión puede ser una unión directa o una unión indirecta a través de una molécula o moléculas intermediarias. En **604**, la sonda molecular se arrastra/empuja a través del nanoporo para empujar el sitio de unión de la sonda-indicador contra el nanoporo. En **606** se lee la secuencia por delante del sitio de unión. En **608** se usa la secuencia leída para determinar que se ha capturado un indicador-molécula diana y, en algunos casos, esta lectura se puede usar para determinar de qué muestra provino el indicador-diana en un experimento de múltiples muestras. La molécula diana se puede unir a un sitio específico en la sonda molecular y dar una secuencia única. Dado que la identidad de la molécula diana es conocida. La molécula diana se puede liberar, recoger, contar y agrupar selectivamente para su procesamiento y/o uso adicional. En algunos casos, la secuencia de sonda por delante del sitio de unión se lee utilizando secuenciación por síntesis con marcas (véanse, por ejemplo, las **figuras 2C y 2D**) **606**.

La **figura 15** es un flujo del procedimiento para contar, agrupar y recoger la molécula diana utilizando una sonda molecular retenida en un nanoporo. En **702**, la molécula diana está unida a una sonda molecular conocida retenida en un nanoporo. En **704**, la identidad de la molécula diana se determina basándose en la secuencia de sonda por delante del sitio de unión del indicador-molécula diana en la sonda. En **708**, el indicador-molécula diana se libera de la sonda para recogerlo, agruparlo y/o contarlos para su procesamiento y/o uso adicional.

La **figura 16** es un flujo del procedimiento para detectar, identificar, contar, agrupar y/o recoger moléculas de proteína diana utilizando una sonda molecular retenida en un nanoporo. En **802** se aíslan proteínas de la muestra. En **804**, las proteínas aisladas se marcan con iminobiotina, biotina o un aptámero de ARN antiavidina. En **806** se añade anticuerpo marcado con indicador a las proteínas y se deja incubarlo y unir. En **808**, todos los anticuerpos y las moléculas de ADN indicador libres se arrastran colocando en la mezcla microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina o microesferas magnéticas recubiertas de aptámero de ARN anti-biotina. En **810** se pueden arrastrar todas las proteínas al lateral del tubo de reacción usando una fuente magnética. En **812** se elimina el sobrenadante, se enjuagan las microesferas/proteínas/anticuerpos/ADN indicador con nuevas soluciones amortiguadoras numerosas veces. En **814**, las moléculas de proteína de muestra se liberan de la atracción magnética y se vuelven a suspender. En **816** se pueden romper los enlaces de estreptavidina/iminobiotina reduciendo el pH de la solución, o se agrega enzima ARNasa para destruir el aptámero de ARN anti-biotina o antiavidina. En algunos casos, **816** es antiavidina, que puede liberar moléculas cuando se cambia el pH. El resultado es una agrupación de proteínas de muestra que están marcadas con anticuerpos y moléculas indicadoras y en la solución no hay anticuerpos/moléculas indicadoras libres ni unidos a proteínas.

La **figura 17** es un flujo del procedimiento para detectar, identificar, contar, agrupar y/o recoger moléculas de proteína diana utilizando una sonda molecular retenida en un nanoporo. En **902** se aíslan proteínas de la muestra. En **904**, las proteínas aisladas se marcan con iminobiotina, biotina o un aptámero de ARN antiavidina. En **906** se añade anticuerpo marcado con indicador a las proteínas y se deja incubarlo y unir. En **908**, todos los anticuerpos y las moléculas de ADN indicador libres se arrastran colocando en la mezcla microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina o microesferas magnéticas recubiertas de aptámero de ARN anti-biotina. En **910** se pueden arrastrar todas las proteínas al lateral del tubo de reacción usando una fuente magnética. En **912** se elimina el sobrenadante, se enjuagan las microesferas/proteínas/anticuerpos/ADN indicador con nuevas soluciones amortiguadoras numerosas veces. En **914**, las moléculas de proteína de muestra se liberan de la atracción magnética y se vuelven a suspender. En **916** se agrega proteasa K para disolver todas las proteínas. En **918** se eleva la temperatura para desnaturalizar la proteasa K. En **920**, la muestra se enfría para usarla en la matriz de nanoporos o se almacena para una posible caracterización o uso adicional.

La **figura 18** ilustra la estructura de una molécula de proteína unida a un anticuerpo marcado con indicador. La molécula indicadora puede ser cualquier molécula que se pueda unir a la secuencia de sonda. Ejemplos de moléculas indicadoras incluyen ADN, ARN, ADNc, ARNip, ARNhc, ARNp, ANP, GNA, morfollinos o cualquier otro polímero o resto que se una a la hebra de la sonda polimérica.

La **figura 19** es un flujo del procedimiento para caracterizar la molécula diana (por ejemplo, una proteína) unida al indicador y al anticuerpo utilizando una sonda molecular retenida en un nanoporo. En **1002**, se agregan a la matriz de nanoporos moléculas de proteína unidas a los anticuerpos marcados con indicador. Los nanoporos de la matriz de nanoporos retienen una matriz de sondas moleculares. La identidad y la ubicación de las sondas moleculares retenidas se pueden determinar utilizando las técnicas descritas anteriormente. Se empieza haciendo funcionar las matrices de nanoporos, arrastrando sondas moleculares a los nanoporos para retenerlas y verificarlas. En **1004**, la sonda molecular se arrastra/empuja, por ejemplo, bajo un campo eléctrico, para empujar el sitio de unión de la molécula indicadora contra el nanoporo. En **1006** se lee la secuencia por delante del sitio de unión del indicador. En **1008** se puede determinar la identidad de la molécula indicadora, por tanto, el anticuerpo unido a la molécula indicadora y la molécula de proteína unida al anticuerpo, basándose en la secuencia de sonda leída.

La **figura 20** es un flujo del procedimiento para caracterizar moléculas diana de diferentes muestras utilizando sondas moleculares retenidas en un nanoporo. Dado que el sitio de unión de la sonda de una molécula indicadora es exclusivo de la molécula indicadora. Si se hace que las moléculas indicadoras para los mismos anticuerpos que se usan para diferentes muestras sean diferentes entre sí, podemos identificar de qué muestra proviene la molécula diana observando la señal producida cuando está unida una molécula indicadora determinada. Por ejemplo, los anticuerpos

utilizados para que se unan a la peroxidasa de hidrógeno en la muestra A están marcados con la molécula indicadora M, los anticuerpos para que se unan a la peroxidasa de hidrógeno en la muestra B están marcados con las moléculas indicadoras N. M y N son iguales, salvo que N es tres nucleótidos más larga que M. M y N producirán señales diferentes cuando estén unidas a la sonda molecular y cuando se lea la secuencia de sonda cuando se empuje el sitio de unión del indicador contra el nanoporo. La fuente de las proteínas unidas a la sonda se puede determinar basándose en dichas señales. En **1102** se aíslan proteínas de diferentes muestras y se unen por separado a anticuerpos marcados con indicadores únicos. Las moléculas indicadoras unidas a un tipo determinado de anticuerpo son diferentes y se unen a diferentes ubicaciones en la sonda molecular para diferentes muestras. En **1104** se mezclan moléculas de anticuerpo-indicador-proteína de diferentes muestras. En **1106**, las moléculas de anticuerpo-indicador-proteína de diferentes muestras se caracterizan juntas utilizando la misma matriz de nanoporos. En **1108**, la identidad de la proteína unida a una sonda molecular retenida en un nanoporo se puede determinar a partir de la señal eléctrica de la sonda molecular cuando la sonda molecular se coloca de tal manera que se empuja el sitio de unión del indicador contra el nanoporo y se lee la secuencia por delante de la molécula indicadora. La caracterización de diferentes muestras juntas utilizando la misma matriz de nanoporos permite una comparación cuantitativa superior de dos muestras, ya que están sujetas a las mismas condiciones de caracterización. Por ejemplo, se puede contar el número de peroxidasa de hidrógeno de la muestra A y B y determinar su proporción. En **1108**, al final de la caracterización, las moléculas capturadas por la sonda se pueden liberar, agrupar, contar, recoger y/o clasificar selectivamente para su análisis y/o uso adicional. Por ejemplo, la peroxidasa de hidrógeno capturada de la muestra A se puede liberar de la matriz de nanoporos al mismo tiempo y recoger y contar, ya que los nanoporos son direccionables individual y eléctricamente.

Las moléculas diana se pueden recoger y recuperar al final de la caracterización para su procesamiento y/o uso adicional. Por tanto, las técnicas descritas en el presente documento permiten la caracterización de una sola molécula en tiempo real, ya que la molécula diana caracterizada se puede recoger, contar y aislar a medida que se caracteriza la molécula.

Para el análisis cuantitativo, las moléculas diana y las moléculas indicadoras diana (cualquiera que se una a la secuencia de sonda) se pueden unir con marcas de lectura única (por ejemplo, marca química que se desprende y emite una señal cuando se lee la molécula diana por primera vez). Las marcas de lectura única no se pueden volver a unir a las moléculas diana. La presencia o ausencia de la señal emitida cuando se desprende la marca de lectura única se puede usar para determinar si la molécula se ha contado o se ha caracterizado previamente.

Las técnicas descritas en el presente documento se pueden aplicar para detectar, contar, clasificar, agrupar y/o enriquecer muestras de baja concentración, tales como, por ejemplo, unas pocas moléculas a la vez.

La presente divulgación proporciona diversos ejemplos para detectar moléculas. En algunos casos, se puede unir un indicador de ADNmc a cada proteína en una solución que tiene una composición desconocida. La molécula indicadora se puede arrastrar a continuación a un poro y detener. Se puede tomar una sola lectura que identifica la proteína. Este procedimiento puede estar limitado en el número de proteínas diferentes que se pueden identificar porque solo hay una posición de parada para leer.

En otro ejemplo, se puede unir un indicador de ADNmc a cada proteína en una solución que tiene una composición desconocida. El indicador se puede unir a una sonda molecular que está retenida en un poro. La sonda molecular puede tener una región de dirección que se lee antes o después de la hibridación con un indicador utilizando badenes. En este procedimiento, hay muchas más sondas que se pueden usar, por lo tanto, en una matriz de poros. La dirección puede permitir la identificación de muchas hebras diferentes. Como ejemplo, la sonda puede tener 4 niveles para cada parada de badén y 6 paradas de badén, lo que arroja 4096 direcciones diferentes. Usando este enfoque, se pueden liberar moléculas seleccionadas de la matriz de nanoporos y clasificarlas, agruparlas y archivarlas.

En otro ejemplo, se puede unir un indicador de ADNmc a proteínas en una solución que tiene una composición desconocida. En algunos casos, muchas o todas las proteínas se pueden aislar del sobrenadante bruto. En algunos casos, las moléculas indicadoras libres flotantes se arrastran. Las proteínas se pueden destruir y/o degradar a continuación (por ejemplo, con proteasa). En algunos casos, esto deja solo al ADNmc indicador en la mezcla de reacción que representa las proteínas originales que había en la solución original. Estos indicadores de ADNmc se pueden colocar a continuación en una matriz con ADNmc de sonda unido en los poros. En algunos casos, los indicadores se unen a las sondas y la señal de parada resultante representa una captura o lectura de una proteína. En algunos modos de realización, las proteínas ya no existen, por lo que no se pueden liberar posteriormente de la matriz de nanoporos y clasificarlas, agruparlas y archivarlas.

En otro ejemplo, la molécula en solución no es una proteína. La molécula puede ser ADNmc por ejemplo. La unión del ADN libre en solución a una sonda de ADNmc retenida en el poro puede permitir la detección de hebras de ADN específicas y la clasificación, agrupación y archivo de estas hebras seleccionadas. En algunos casos, las sondas de la matriz se expulsan de la matriz y se recogen.

Los procedimientos para detectar moléculas se pueden valer del uso de badenes. Ejemplos de badenes y usos de los mismos se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2012/0160681 y 2012/0160688, que se

incorporan en su totalidad en el presente documento por referencia.

La **figura 21** ilustra la unión de badenes a una región de dirección de una sonda molecular retenida en un nanoporo. Los badenes específicos de la región de dirección se pueden unir a esta región para permitir su identificación y lectura rápida mediante un detector de nanoporo. Esta región se puede identificar rápidamente al introducir la sonda molecular en un nanoporo hasta que los badenes se detengan en la entrada del nanoporo y se midan señales eléctricas cuando la sonda se estanca en el poro. La región de dirección se puede diseñar de modo que se una a tipos específicos de badenes. Por ejemplo, en la región de dirección se pueden genomanipular polinucleótidos hechos de isodG y poliisodC en patrones singulares. Se pueden situar badenes (por ejemplo, los badenes hechos de isodG y/o isodC) que se unen específicamente a isodG e isodC en la región de dirección para permitir una lectura fácil de la información de la dirección.

La **figura 22** ilustra un ejemplo de detector de nanoporo que comprende electrodos A, una superficie hidrófila B que separa dos pocillos independientes construidos expresamente con un pequeño orificio entre ellos sobre el que se crea una bicapa C de material lipídico. El nanoporo D se inserta (por ejemplo, por difusión) a través de una solución salina conductora E. El detector de nanoporo de la **figura 22** puede ser uno de una pluralidad de detectores de nanoporo en una matriz de detectores de nanoporo.

En otro modo de realización, una sonda polinucleotídica comprende una estructura mostrada en la **figura 23**. La sonda molecular comprende una primera estructura prevoluminosa en un extremo, una segunda estructura prevoluminosa en el otro extremo, un primer identificador de dirección (DI1), un segundo identificador de dirección (DI2), un sitio de unión para el ADN indicador y un identificador del indicador.

La primera estructura prevoluminosa forma una primera estructura voluminosa en unas primeras condiciones. La segunda estructura prevoluminosa forma una segunda estructura voluminosa en unas segundas condiciones.

Una estructura prevoluminosa, como se usa en el presente documento, es una estructura que puede formar una estructura voluminosa bajo ciertas condiciones (por ejemplo, a cierta temperatura, presencia/ausencia de ciertos compuestos).

Una estructura voluminosa, como se usa en el presente documento, es una estructura que estanca la molécula polinucleotídica de prueba en un nanoporo en unas condiciones de trabajo hasta que las condiciones de trabajo cambian a otras condiciones en las que la estructura voluminosa se convierte en la estructura prevoluminosa u otras estructuras que ya no pueden estancar la molécula polinucleotídica de prueba.

En un modo de realización, una estructura prevoluminosa es una estructura oligonucleotídica en una molécula polinucleotídica que puede formar una estructura voluminosa bajo ciertas condiciones. La estructura prevoluminosa puede ser un polinucleótido mc o un polinucleótido bc. Los ejemplos de estructuras voluminosas incluyen, sin limitación, estructuras 2-D y 3-D tales como estructuras polinucleotídicas bicatenarias (ARN bicatenario, ADN bicatenario o ARN-ADN híbrido), estructuras polinucleotídicas de horquilla, estructuras de múltiples horquillas y estructuras de múltiples brazos.

En otro modo de realización, la estructura prevoluminosa forma una estructura voluminosa por medio de la interacción con un ligando específico de la estructura prevoluminosa. Los ejemplos de dicho par de estructura prevoluminosa/ligando incluyen, sin limitación, biotina/estreptavidina, antígeno/anticuerpo y glúcido/anticuerpo.

En un modo de realización, la estructura voluminosa se forma a partir de una estructura oligonucleotídica prevoluminosa, por ejemplo, una estructura oligonucleotídica formada a partir de una estructura prevoluminosa en una molécula polinucleotídica mc de prueba. Los ejemplos de estructuras polinucleotídicas u oligonucleotídicas voluminosas incluyen, sin limitación, hebras de ácido nucleico en horquilla, hebras de ácido nucleico de antisentido hibridado, moléculas de brazos múltiples y de ADN o ARN tridimensionales que se autohibridan.

En otro modo de realización, la estructura voluminosa se forma por medio de interacciones de un par de estructura prevoluminosa/ligando como se describe en el presente documento.

En un ejemplo, tanto la primera como la segunda estructuras prevoluminosas son estructuras prevoluminosas de polinucleótidos/oligonucleótidos. La primera estructura prevoluminosa forma la primera estructura voluminosa correspondiente a una primera temperatura. La segunda estructura prevoluminosa forma la segunda estructura voluminosa correspondiente a una segunda temperatura. Y la primera temperatura es más alta que la segunda temperatura.

En otro ejemplo, la primera estructura prevoluminosa es una estructura prevoluminosa de polinucleótido/oligonucleótido que forma la primera estructura voluminosa por medio de la interacción con un ligando específico de la primera estructura prevoluminosa. En un ejemplo preferente, la formación de la primera estructura voluminosa es independiente de la temperatura. Se prefiere que la segunda estructura prevoluminosa sea tal que la conversión entre la estructura prevoluminosa y la estructura voluminosa correspondiente sea dependiente de la

temperatura.

Como se muestra en la **figura 23**, la sonda molecular comprende además identificadores de dirección: un primer identificador de dirección cerca de la primera estructura prevoluminosa, y un segundo identificador de dirección cerca de la segunda estructura prevoluminosa.

Las secciones DI1 y DI2 pueden comprender además uno o más identificadores adicionales, tales como identificadores de señal de referencia, identificadores de fuente de sonda e identificadores de sonda.

Las secciones I1 e I2 en la **figura 23** pueden comprender uno o más identificadores como se describe en el presente documento.

En un modo de realización, un procedimiento para inmovilizar una diana que forma un complejo/compuesto con una molécula indicadora (indicador/diana) comprende:

A1) preparar una sonda polinucleotídica, en el que el polinucleótido comprende una estructura mostrada en la **figura 23** como se describe en el presente documento y la molécula indicadora se puede unir al sitio de unión para la molécula indicadora;

(B1) formar una primera estructura voluminosa (BS1) a partir de la primera estructura prevoluminosa en unas primeras condiciones,

(B2) aplicar un potencial eléctrico para hacer fluir la sonda polinucleotídica mc a través de un nanoporo de un detector de nanoporo,

(B3) formar una segunda estructura voluminosa (BS2) a partir de la segunda estructura prevoluminosa en unas segundas condiciones,

(B4) en algunos casos, aplicar otro potencial eléctrico para invertir el flujo del polinucleótido mc de prueba hasta que la BS2 detenga el polinucleótido mc de prueba antes de la zona de constricción del nanoporo,

(B5) en algunos casos, identificar identificadores de la sonda polinucleotídica (por ejemplo, el primer identificador de dirección, el segundo identificador de dirección, identificador de la sonda, identificadores de la señal de referencia e identificadores de la fuente de la sonda) para confirmar la formación adecuada de la(s) estructura(s) voluminosa(s), e identificar la sonda polinucleotídica; esto último es importante cuando hay más de un nanoporo en una matriz de nanoporos, en la que cada nanoporo es direccionable: al identificar la sonda polinucleotídica, se establece una conexión entre el nanoporo direccionable y la diana,

(B6) poner en contacto la sonda polinucleotídica mc con el indicador/diana para formar un complejo de sonda polinucleotídica mc que comprende un segmento de molécula indicadora-sonda polinucleotídica;

(B7) aplicar otro potencial eléctrico para hacer fluir el complejo de sonda polinucleotídica a través del nanoporo hasta que el segmento de molécula indicadora-sonda polinucleotídica se detenga antes de una zona de constricción del nanoporo,

(B8) obtener un primer conjunto de señales eléctricas cuando el segmento de molécula indicadora-sonda polinucleotídica se estanca dentro del nanoporo durante un tiempo de permanencia,

(B9) determinar si la molécula indicadora está inmovilizada mediante la identificación de la estructura que está por delante del segmento de molécula indicadora-sonda polinucleotídica en la dirección del flujo de la sonda polinucleotídica, cuando la molécula indicadora forma un compuesto/complejo con la diana, la diana se inmoviliza cuando la molécula indicadora está inmovilizada, y

(B10) en algunos casos, identificar uno o más identificadores en I2 y LI (por ejemplo, identificador de la sonda, identificadores de la señal de referencia e identificadores de la fuente de la sonda).

El procedimiento descrito en el presente documento se puede usar para detectar y/o cuantificar la molécula indicadora y la diana unida a la molécula indicadora a nivel molecular.

En algunos modos de realización, la molécula indicadora es la diana.

En algunos modos de realización, el procedimiento se puede aplicar además a la inmovilización de múltiples moléculas indicadoras/diana utilizando una matriz de nanoporos, en la que el procedimiento descrito en el presente documento se aplica a una sonda polinucleotídica individual, una molécula indicadora/diana individual y cada nanoporo direccionable individualmente. Una vez que se inmovilizan e identifican las moléculas indicadoras/diana, las moléculas indicadoras/diana se detectan/cuantifican a nivel molecular. Además, las moléculas indicadoras/diana inmovilizadas

se pueden concentrar/clasificar/purificar adicionalmente controlando las condiciones de los nanoporos individuales (por ejemplo, el potencial eléctrico de las mismas) en el que está retenida la sonda polinucleotídica.

Este procedimiento se puede utilizar en sensores de electrodo/nanoporo masivamente paralelos, controlables individualmente. Se puede construir una matriz de estos sensores de electrodo/nanoporo que contiene más de 1.000, 10.000, 100.000 o millones de sensores de electrodo/nanoporo en una superficie semiconductora esencialmente plana. Se pueden incorporar circuitos de control en el semiconductor para crear sensores de electrodo/nanoporo legibles individualmente y controlables individualmente, y estos sensores se pueden usar para leer cualquier polímero que quepa dentro del nanoporo; incluyendo todas las formas de ADN y ARN, incluyendo, pero sin limitarse al ADN metilado.

Los procedimientos para detectar moléculas pueden, en algunos casos, emplear despliegue de proteínas y flujo a través de un nanoporo. Véase, por ejemplo, J. Nivala, D. B. Marks y M. Akeson, "Unfoldase-mediated protein translocation through an α -hemolysin nanopore," Nature Biotechnology, 2013, DOI: 10.1038/nbt.2503, que se incorporan en su totalidad en el presente documento por referencia. A través de un nanoporo de la presente divulgación se puede introducir una proteína desplegada. Se puede generar una secuencia de aminoácidos de la proteína desplegada al hacer fluir la proteína a través del nanoporo.

Ejemplos

Los ejemplos a continuación son ilustrativos de diversos modos de realización de la presente divulgación y no limitativos.

Ejemplo 1. Formación de bicapas e inserción de poros

La formación de bicapas y la inserción de poros en la cubeta de lectura utilizando una configuración de jeringa manual y una configuración de bomba de jeringa da como resultado un alto rendimiento de bicapa y poros únicos de hemolisina. Se forman bicapas en ambas configuraciones por medio del flujo de una solución de KCl 1 M o 0,3 M y burbujas de aire a través de la superficie de un chip cubierta de lípidos y la aplicación de estímulos eléctricos. Dos procedimientos de aplicación de hemolisina dan como resultado un alto rendimiento de poros únicos. Un procedimiento comprende las siguientes etapas: (1) premezclar hemolisina con lípido en decano, (2) hacer fluir la mezcla de hemolisina-lípido sobre la superficie del chip e incubar durante unos minutos, (3) formar bicapas y (4) aplicar un estímulo eléctrico para electroporar los poros en las bicapas. El segundo procedimiento comprende las siguientes etapas: (1) hacer fluir lípido en decano sobre la superficie del chip, (2) formar bicapas, (3) hacer fluir hemolisina a través de la superficie del chip, (4) hacer fluir inmediatamente un lavado de KCl y (5) aplicar un estímulo eléctrico para electroporar los poros en las bicapas. Durante la etapa de electroporación en ambos procedimientos de aplicación, el chip se puede calentar para hacer que las bicapas sean más fluidas para la inserción de hemolisina. La temperatura se reduce a temperatura ambiente o más baja, ya sea durante o después de la etapa de electroporación para aumentar la vida útil de los poros.

Ejemplo 2. Configuración de la cubeta de lectura

Con referencia a la **figura 24** y la **figura 25**, la cubeta de lectura se ensambla en el paquete del chip colocando directamente una junta en la parte superior del chip semiconductor. El grosor de la junta varía de 50 μm a 500 μm . La junta puede estar compuesta de plástico con adhesivos sensibles a la presión en uno o ambos lados, membrana de silicona o elastómero flexible, tal como EPDM. La junta se puede hacer de cualquier conformación. Encima de la junta (por ejemplo, hecha de PMMA laminado con PSA) se coloca una tapa de plástico rígido (por ejemplo, hecha de PMMA) y se puede sellar a la junta a través del adhesivo sensible a la presión o mediante un mecanismo de bloqueo que aplique una fuerza de compresión a la junta. La tapa tiene vías de entrada y salida individuales o múltiples que se utilizan para hacer fluir los reactivos y el aire a través de la cubeta de lectura.

En algunos casos, el tamaño total de la junta es cuadrada de 4 mm por 4 mm. En algunos casos, el volumen de la cubeta de lectura es de aproximadamente 1,5 μl para la configuración de la junta de 500 μm de grosor. Aproximadamente 15 a 20 electrodos están cubiertos bajo la junta en algunos modos de realización.

Ejemplo 3. Bomba de jeringa de fluidos

Con referencia a la **figura 26** y la **figura 27**, el caudal de aire y líquido a través del chip se controla por medio de una bomba de fluidos y válvulas de inyección. El caudal generado por la bomba varía desde 0,01 $\mu\text{l/s}$ hasta más de 100 $\mu\text{l/s}$. El controlador de fluidos tiene una válvula de selección de múltiples vías con una vía de entrada de amortiguador, una vía de salida y vías de inyección de lípidos/hemo.

Un ejemplo de bomba de fluidos de laboratorio es la bomba de jeringa Kloehn Versapump 6 (V6). La bomba tiene una válvula de inyección de 5 vías de montaje frontal. Durante el experimento, se extraen diferentes muestras en la jeringa y se expulsan a través de la vía de salida, que fluye hacia la cubeta de lectura. El caudal se controla mediante un motor de pasos en la bomba.

Ejemplo 4. Protocolo de flujo en la bomba de jeringa

5 El ejemplo logra más del 90 % de cobertura de lípidos y 30 % de inserción de poros de hemolisina. La inyección de una mezcla de DPhPC y hemolisina a través de la superficie del chip también logró un rendimiento de inserción de poros superior al 50 %.

Preparación de la bicapa:

- 10 (a) Extraer 100 μ l de KCl 1 M y hacerlos fluir a través del sistema de cubeta de lectura a un caudal de 10 μ l/s.
- (b) Acondicionar los electrodos del chip aplicando incrementos de potencial usando un electrodo de referencia de Ag/AgCl.
- 15 (c) Inyectar 40 μ l de DPhPC de 7,5 mg/ml en decano a través del chip a un caudal de 1 μ l/s.
- (d) Inyectar 20 μ l de burbujas de aire a través del chip.
- (e) Inyectar 100 μ l de KCl a través del chip a un caudal de 1 μ l/s.

20 Inserción de poros de hemolisina:

- (a) Inyectar 50 μ l de solución de hemolisina a través de la superficie del chip a un caudal de 1 μ l/s.
- 25 (b) Hacer fluir 100 μ l de solución de KCl a través de la superficie del chip.
- (c) Modular el potencial del electrodo para la inserción de poros inmediatamente después de la etapa a) antes de la etapa b) o después de la etapa b).

Ejemplo 5. Protocolo de flujo utilizando una jeringa manual

Preparación de la bicapa:

- 35 (a) Extraer 100 μ l de KCl 1 M y hacerlos fluir a través del sistema de cubeta de lectura.
- (b) Acondicionar los electrodos del chip aplicando incrementos de potencial usando un electrodo de referencia de Ag/AgCl.
- 40 (c) Hacer fluir a través una mezcla de hemolisina-lípido que contenga 7,2 mg/ml de DPhPC en decano y 5 μ g/ml de hemolisina, seguidos de 120 μ l de KCl
- (d) Aplicar una serie de impulsos eléctricos negativos para eliminar los recubrimientos de lípidos.
- 45 (e) Hacer fluir a través 20 μ l de KCl y 20 μ l de burbujas dos veces, seguidos de 120 μ l de KCl. Repetir las etapas d y e aproximadamente 4 veces o hasta que al menos el 80 % de los electrodos muestren corrientes superiores a 300 pA al aplicar impulsos eléctricos.
- (f) Hacer fluir a través 20 μ l de KCl y 20 μ l de burbujas dos veces, seguidos de 120 μ l de KCl para recuperar los electrodos con bicapas.

50 Inserción de poros de hemolisina:

- (a) Aumentar la temperatura del chip a aproximadamente 55 grados Celsius.
- 55 (b) Aplicar impulsos eléctricos para electroporar los poros en las bicapas.

El procedimiento experimental anterior da como resultado un rendimiento de poros individuales de 151 a 50 (aproximadamente 60 % a 20 % de inserción de poros de hemolisina, respectivamente).

60 La temperatura del chip se puede modular durante el experimento. La configuración del electrodo de referencia también se ajustará para incluir potencialmente tinta de Ag/AgCl pintada en la cubeta de lectura.

Ejemplo 6. Materiales y configuración

65 Reactivos: KCl 0,3 M Hepes 20 mM pH 7

Hemolisina:

Hemo 5 µg/ml en DPhPC de 7,2 mg/ml en decano y glicerol al 2,5 %

5 Hemo 20 µg/ml en DPhPC de 7,2 mg/ml en decano y glicerol al 2,5 %

ADN:

ADN 30T 30 µM con estreptavidina 7,5 µM

10 ADN 30T 30 µM con estreptavidina 7,5 µM y glicerol al 0,83 %

Chips:

15 Rev 2 pocillo profundo, tapa grande

Rev 1 pocillo profundo, tapa grande

Ejemplo 7. Protocolo de formación de bicapas

- 20
1. Hacer fluir a través 20 µl de DPhPC de 7,5 mg/ml en decano seguidos de 120 µl de KCl
 2. Ejecutar bilayerpop3b que aplica una serie de impulsos eléctricos negativos que varían desde -250 mV a -1 V con una corriente de desactivación de 300 pA
 - 25 3. Lavar los chips con 2 * (20 µl de KCl, 20 µl de burbujas) y 120 µl de KCl.
 4. bilayerpop3b
 - 30 5. Repetir las etapas 3 y 4 hasta que al menos el 80 % de las celdas se desactiven entre -400 mV y -700 mV de impulso.
 - a. Aproximadamente de 4 a 8 repeticiones
 - 35 6. Recuperar las celdas con 2 * (20 µl de KCl, 20 µl de burbujas) y 120 µl de KCl.

Ejemplo 8. Protocolo de inserción de poros

Procedimiento 1: mezclar hemo con lípido al inicio del experimento

- 40
1. Después de formar las bicapas, colocar calentadores de manos sobre la cubeta de lectura.
 2. Electroporar los poros en las bicapas (getpore12b).

45 **Procedimiento 2:** hacer fluir hemo sobre las bicapas seguido de una primera electrodesporación con lavado:

1. Después de formar las bicapas, hacer fluir 20 µl de hemo de 100 µg/ml en KCl 0,3 M y glicerol al 5 % a través de la cubeta de lectura
- 50 2. Lavar con 20 µl de burbujas y 80 µl de KCl
3. Electroporar los poros en las bicapas (getpore12b) con calentadores de manos en la parte superior de la cubeta de lectura.

Ejemplo 9. Formación de bicapas y salto automatizado con bomba

La **figura 28** muestra la tensión de salto de la bicapa frente a la ubicación de la celda en condiciones repetidas de lavado de generación de bicapas. El protocolo automatizado de lavado con burbujas y KCl permite una formación de bicapas homogénea. La **tabla 1** muestra la formación de bicapa y el rendimiento de salto en diversas condiciones (por ejemplo, con hemolisina y lípido o sin hemolisina).

60

Tabla 1. Formación de bicapas y salto

ID del chip	% cubierto	% salto
120830_CC 01-1	99 %	76 %
120824_CC 06-1	94 %	59 %
120801_CC 01-1	92 %	81 %
120803_MT 01-1	73 %	51 %
120802_CC - 01-1	87 %	93 %
120731_MT 01-1	100 %	89 %
120803_MT 01-1	73 %	51 %

Ejemplo 10. Forma de onda aplicada

La **figura 29** muestra un ejemplo de una forma de onda aplicada de canal abierto y datos de captura de ADN. La forma de onda se denomina chipcode042b y tiene una tensión aplicada en el eje vertical que varía desde -0,1 hasta 0,2 voltios. El tiempo se muestra en el eje horizontal y varía desde 0 hasta 6 segundos. La forma de onda de captura va seguida de una recarga de -50 mV durante 33 segundos.

Ejemplo 11. Datos de canal abierto

El procedimiento 1 del ejemplo 8 se utiliza para llevar a cabo diversos protocolos. Los resultados de los protocolos se presentan en las **figuras 30-32**.

La **figura 30** muestra una curva de la corriente en el eje vertical que varía desde 0 hasta 160 pA y el tiempo en el eje horizontal que varía desde 0 hasta 4 segundos. Hay 151 líneas entre 7,02211 y 73,6021 pA. El protocolo es el procedimiento 1 del ejemplo 8.

La **figura 31** muestra una curva de la corriente en el eje vertical que varía desde 0 hasta 300 pA y el tiempo en el eje horizontal que varía desde 0 hasta 4,5 segundos. Hay 80 líneas entre 12,0879 y 100 pA. El gráfico muestra los datos recogidos cuando se utiliza una bomba de jeringa. El protocolo es el procedimiento 1 del ejemplo 8.

La **figura 32** muestra una curva de la corriente en el eje vertical que varía desde 0 hasta 160 pA y el tiempo en el eje horizontal que varía desde 0 hasta 4 segundos. Hay 117 líneas entre 26,2679 y 75,6827 pA. El protocolo es el procedimiento 2 del ejemplo 8.

La **tabla 2** muestra un resumen de datos de canal abierto.

Tabla 2. Datos de canal abierto

Experimento	Procedimiento de inserción de hemo	Recuento de poros
01-1_120830	Mezcla de hemo y lípido	151
02-1_120830	Mezcla de hemo y lípido	67
01-1_120829	Mezcla de hemo y lípido	135
02-1_120829	Mezcla de hemo y lípido	80
01-1_120828	Mezcla de hemo y lípido	50
01-1_120823	Mezcla de hemo y lípido	70
02-1_120823	Mezcla de hemo y lípido	56
04-1_120824	Flujo de hemo sobre la bicapa	46
06-1_120824	Flujo de hemo sobre la bicapa	117
07-1_120824	Flujo de hemo sobre la bicapa	85

Ejemplo 12. Captura de ADN

El procedimiento 1 del ejemplo 8 se utiliza para llevar a cabo diversos protocolos. Los resultados de los protocolos se presentan en las **figuras 33-37**.

La **figura 33** muestra una curva de la corriente en el eje vertical que varía desde 0 hasta 300 pA y el tiempo en el eje horizontal que varía desde 0 hasta 4 segundos. El protocolo es el procedimiento 1 del ejemplo 8 y a 160 mV.

La **figura 34** muestra una curva de la corriente en el eje vertical que varía desde 0 hasta 300 pA y el tiempo en el eje horizontal que varía desde 0 hasta 4 segundos. El protocolo es el procedimiento 1 del ejemplo 8 y a 80 mV.

5 La **figura 35** muestra una curva de la corriente en el eje vertical que varía desde 0 hasta 300 pA y el tiempo en el eje horizontal que varía desde 0 hasta 4 segundos. El protocolo es el procedimiento 1 del ejemplo 8 y a 220 mV. En algunos modos de realización, el aumento de la tensión aumenta la tasa de captura. Aumentar la tensión no aumenta necesariamente las capturas de ADN. En algunos casos (por ejemplo, aproximadamente el 50 % de los casos), la adición de ADN rompe la bicapa y/o expulsa el poro de la bicapa.

10 La **figura 36** muestra una curva de la corriente en el eje vertical que varía desde 0 hasta 100 pA y el tiempo en el eje horizontal que varía desde 0 hasta 4 segundos. El protocolo es el procedimiento 2 del ejemplo 8. La tasa de captura es ADN 30T a KCl 0,3 M en la cubeta de lectura utilizando una tensión de captura de 160 mV.

15 La **figura 37** muestra una curva de la corriente en el eje vertical que varía desde 0 hasta 100 pA y el tiempo en el eje horizontal que varía desde 0 hasta 4 segundos. El protocolo es el procedimiento 2 del ejemplo 8 con KCl 0,3 M y ADN 30T 30 μ M con estreptavidina 7,5 μ M.

Ejemplo 13. Captura de ADN

20 La **figura 38** muestra una curva de la corriente frente al tiempo o el recuento de poros en las celdas después de la formación de bicapas (por ejemplo, siguiendo un protocolo automatizado). Las condiciones de formación de poros son KCl 1 M, pH 7,5, temperatura ambiente, 15 mg/ml de lípido DPhPC en decano y 20 μ g/ml de hemolisina en agua a pH 7,5.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para formar una bicapa lipídica para su uso en un sensor con nanoporos, que comprende:
- 5 (a) dirigir una solución amortiguadora en uno o más canales de flujo que comprenden un electrodo que tiene una capa de material sobre el mismo, en el que dicha solución amortiguadora es eléctricamente conductora y en el que dicha capa de material comprende uno o más lípidos;
- 10 (b) poner dicha solución amortiguadora en contacto con dicha capa de material;
- (c) medir una corriente a través de dicho electrodo para determinar si al menos una parte de dicha capa de material ha formado una bicapa lipídica contigua a dicho electrodo; y
- 15 (d) basándose en la determinación de (c), aplicar un estímulo a dicho electrodo para inducir que al menos dicha parte de la capa de material forme dicha bicapa lipídica contigua a dicho electrodo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que, en (c), se aplican una o más tensiones a dicho electrodo, preferentemente en el que dicha tensión se selecciona para romper o alterar la bicapa sobre el electrodo.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el estímulo comprende al menos uno de un flujo de líquido sobre la superficie del electrodo, un flujo secuencial de uno o más líquidos diferentes sobre la superficie del electrodo, el flujo de una o más burbujas sobre la superficie del electrodo, un impulso eléctrico, impulso ultrasónico, impulso compresivo o impulso sónico.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la capa de material comprende una o más proteínas porínicas y uno o más tensioactivos a una concentración inferior a la concentración micelar crítica del tensioactivo o en el que la capa de material comprende al menos dos tipos de lípidos.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos uno o más canales de flujo comprenden una pluralidad de electrodos, en el que dicha pluralidad de electrodos comprende dicho electrodo, opcionalmente en el que el estímulo se aplica simultáneamente a dicha pluralidad de electrodos.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la capa de material comprende una proteína del poro, preferentemente en el que la proteína del poro es porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA), hemolisina α , cualquier proteína que tenga al menos un 70 % de homología con al menos una de porina A de *smegmatis* (MspA) o hemolisina α , o cualquier combinación de las mismas; y opcionalmente comprende además, después de (d), aplicar un estímulo eléctrico a través de dicho electrodo para facilitar la inserción de dicha proteína del poro en dicha bicapa lipídica, preferentemente en el que dicha bicapa lipídica y dicha proteína del poro juntas presentan una resistencia de aproximadamente 1 G Ω o menos o en el que dicha bicapa lipídica sin una proteína del poro presenta una resistencia mayor que aproximadamente 1 G Ω .
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la presión de dicha solución amortiguadora se selecciona de modo que dicha capa de material forme dicha bicapa lipídica sin dicho estímulo.
- 45 8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además, antes de (a), generar dicha capa de material contigua a dicho electrodo, opcionalmente en el que dicha generación comprende:
- dirigir una solución lipídica que comprende dichos uno o más lípidos a través de dichos uno o más canales de flujo; y
- 50 depositar dicha capa de material sobre dicho electrodo, opcionalmente en el que dicha solución lipídica comprende un disolvente orgánico, por ejemplo, en el que dicho disolvente orgánico comprende decano; y opcionalmente el procedimiento que comprende además:
- hacer fluir una solución de proteína del poro contigua a dicha capa de material para depositar una proteína del poro en dicha capa de material; y
- 55 diluir dicha capa de material con una solución iónica y/u otra burbuja en dichos uno o más canales de flujo.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha solución amortiguadora comprende una solución iónica, preferentemente en el que la solución iónica comprende un anión cloruro y, opcionalmente en el que la solución iónica comprende acetato de sodio.
- 60 10. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además, después de (a):
- 65 dirigir una burbuja, por ejemplo, una burbuja de vapor, a través de dichos uno o más canales de flujo; y

poner dicha burbuja en contacto con dicha capa de material para suavizar y/o diluir dicha capa de material.

11. El procedimiento de la reivindicación 1 y al menos un rasgo característico adicional seleccionado de (i) a (ix):

- 5 (i) en el que dichos uno o más lípidos se seleccionan del grupo que consiste en diftanoilfosfatidilcolina (DPhPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), dioleoilfosfatidilmetiléster (DOPME), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y esfingomielinina
- 10 (ii) en el que una superficie de dicho electrodo que está expuesta a dichos uno o más canales de flujo es hidrófila
- (iii) en el que dicho electrodo está dispuesto contiguo a una o más superficies hidrófobas del uno o más canales de flujo, por ejemplo, en el que dichas una o más superficies hidrófobas están silanizadas
- 15 (iv) en el que dichos uno o más canales de flujo están formados en un chip
- (v) en el que dicho electrodo está formado en una superficie de dichos uno o más canales de flujo
- (vi) en el que dichos uno o más canales de flujo están sellados
- 20 (vii) en el que dichos uno o más canales de flujo comprenden una pluralidad de canales de flujo, opcionalmente en el que dicha pluralidad de canales de flujo están separados hidráulicamente entre sí con la ayuda de carriles de guía a lo largo de dicha pluralidad de canales de flujo
- 25 (viii) en el que dicho electrodo es un electrodo direccionable individualmente
- (ix) en el que (c) comprende además determinar si al menos una parte de dicha capa de material ha formado una bicapa lipídica sobre la totalidad o una parte de dicho electrodo.

30 12. Un procedimiento para formar una bicapa lipídica de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un dispositivo de detección con nanoporos, que comprende:

- (a) proporcionar un chip que comprende una pluralidad de electrodos y capas de material contiguas a dicha pluralidad de electrodos, en el que cada una de dichas capas de material comprende un lípido;
- 35 (b) poner en contacto las capas de material con una solución amortiguadora, en el que dicha solución amortiguadora es eléctricamente conductora;
- (c) aplicar un estímulo al menos a un subconjunto de dicha pluralidad de electrodos para inducir que las capas de material formen bicapas lipídicas contiguas a la pluralidad de los electrodos; y
- 40 (d) repetir las etapas (b) y (c), según sea necesario, hasta que al menos aproximadamente el 20 % de dicha pluralidad de electrodos se desactive con un impulso de tensión entre aproximadamente -100 milivoltios (mV) y -1000 mV aplicados a dicha pluralidad de electrodos.

45 13. El procedimiento de la reivindicación 12 y al menos un rasgo característico adicional seleccionado de (i) a (ix):

- (i) en el que dicha pluralidad de electrodos son cada uno individualmente direccionable
- 50 (ii) en el que las etapas (b) y (c) se repiten según sea necesario hasta que al menos aproximadamente el 60 % de dicha pluralidad de electrodos se desactive con dicho impulso de tensión aplicado
- (iii) en el que dicho impulso de tensión aplicado está entre aproximadamente -400 mV y -700 mV
- 55 (iv) en el que el estímulo comprende al menos uno de un flujo de líquido sobre la superficie del electrodo, un flujo secuencial de uno o más líquidos diferentes sobre la superficie del electrodo, el flujo de una o más burbujas sobre la superficie del electrodo, un impulso eléctrico, impulso ultrasónico, impulso compresivo o impulso sónico
- (v) en el que cada una de dichas capas de material comprende una proteína del poro, preferentemente en el que la proteína del poro es porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA), hemolisina α , cualquier proteína que tenga al menos un 70 % de homología con al menos una de porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA) o hemolisina α , o cualquier combinación; y opcionalmente comprende además, después de (c), aplicar un estímulo eléctrico a través de al menos un subconjunto de dichos electrodos para facilitar la inserción de dicha proteína del poro en cada una de dichas bicapas lipídicas
- 60
- 65 (vi) en el que (a) comprende además:

poner en contacto la pluralidad de electrodos con una solución lipídica para formar dichas capas de material, en el que dicha solución lipídica comprende dicho lípido, opcionalmente en el que dicha solución lipídica comprende un disolvente orgánico, tal como decano

5 (vii) en el que dicha solución amortiguadora comprende una solución iónica, preferentemente en el que la solución iónica comprende un anión cloruro y, opcionalmente en el que la solución iónica comprende acetato de sodio

10 (viii) que comprende además, entre las etapas (a) y (b), dirigir una burbuja contigua a cada una de dichas capas de material

(ix) en el que dichos electrodos están sellados en uno o más canales de flujo de dicho chip.

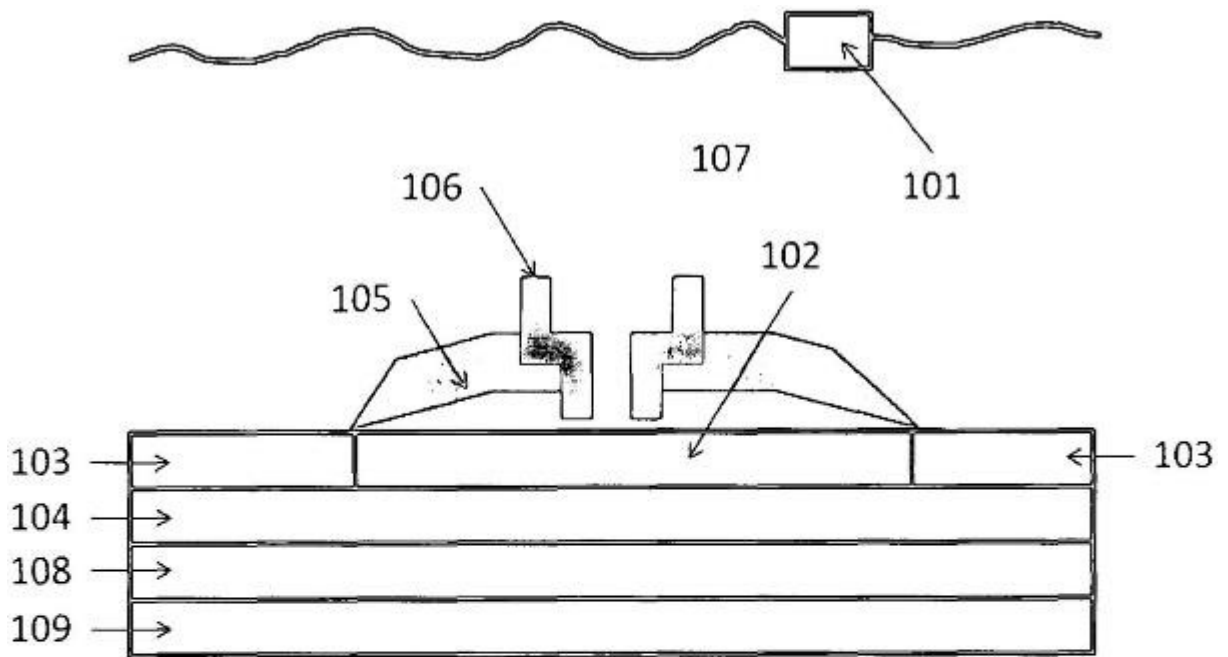


FIG. 1A

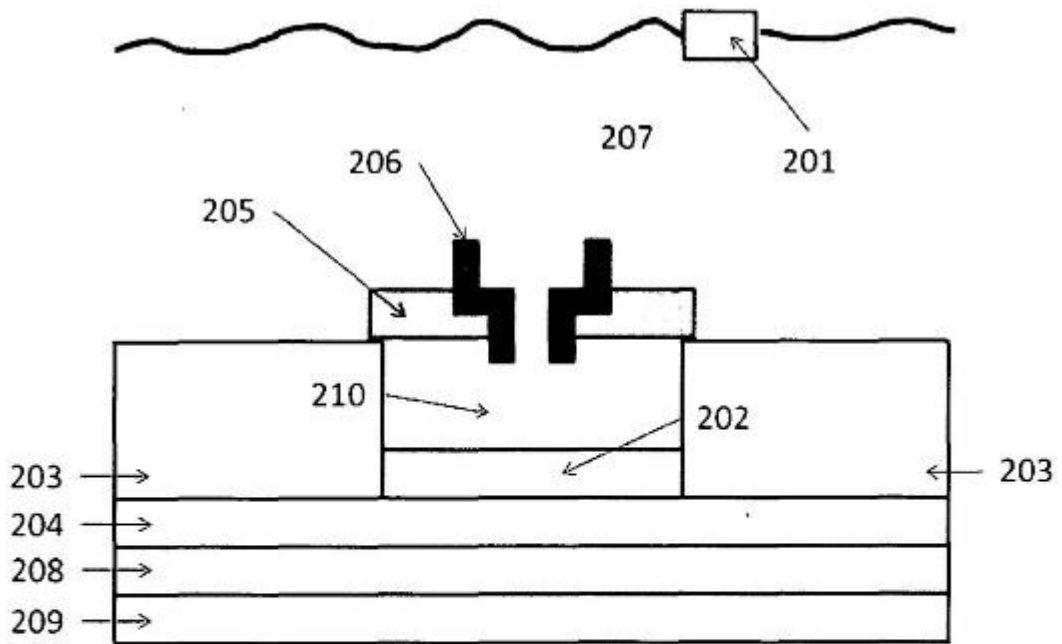


FIG. 1B

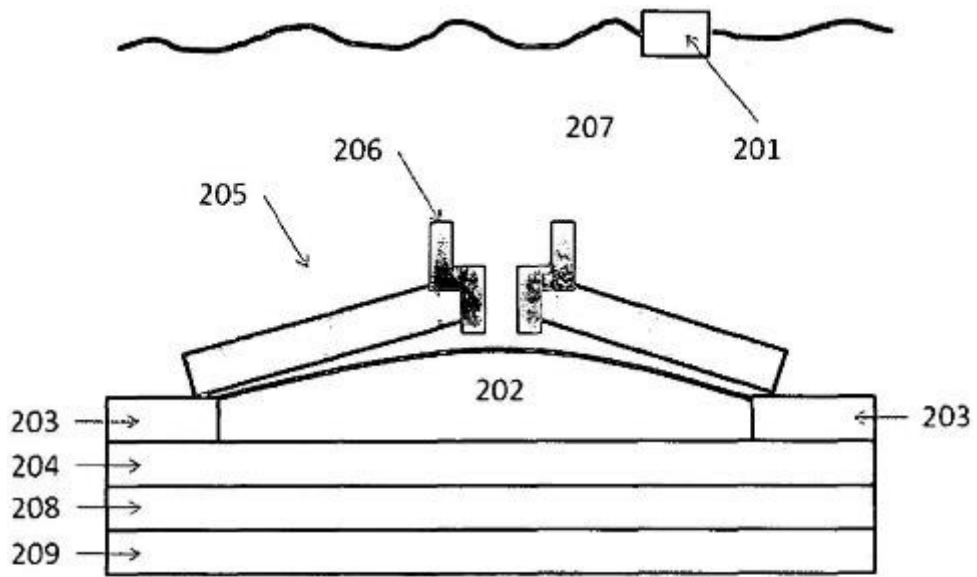


FIG. 1C

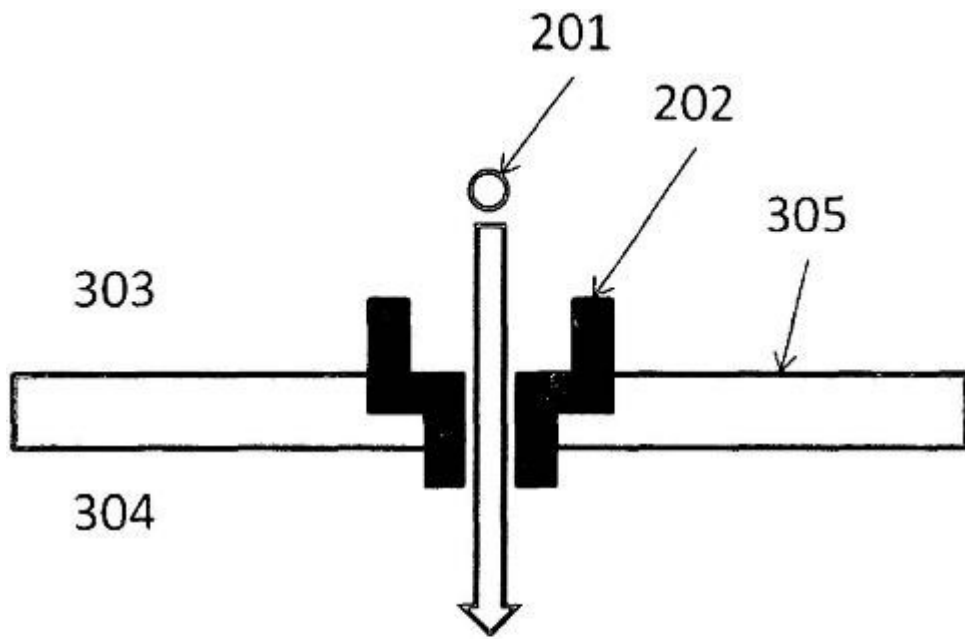


FIG. 2A

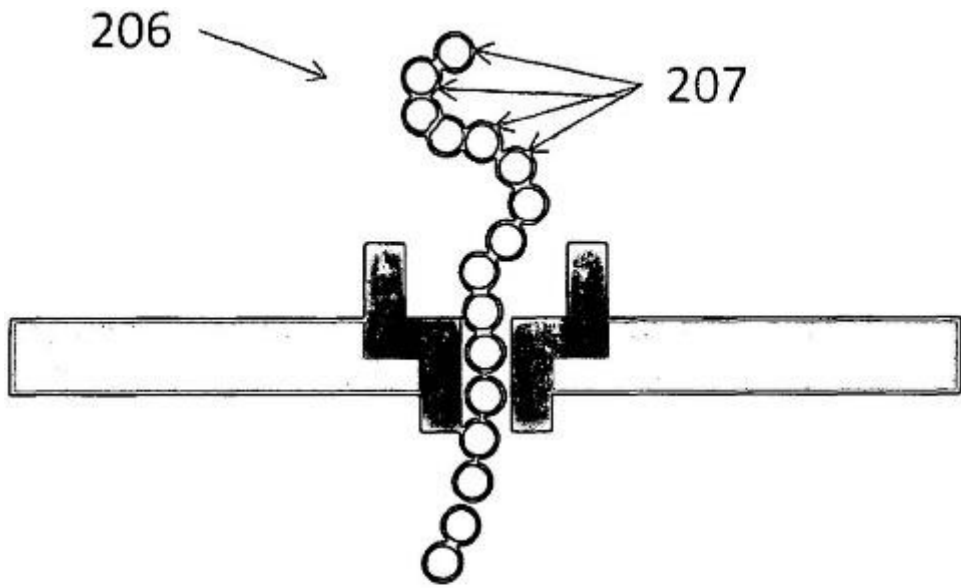


FIG. 2B

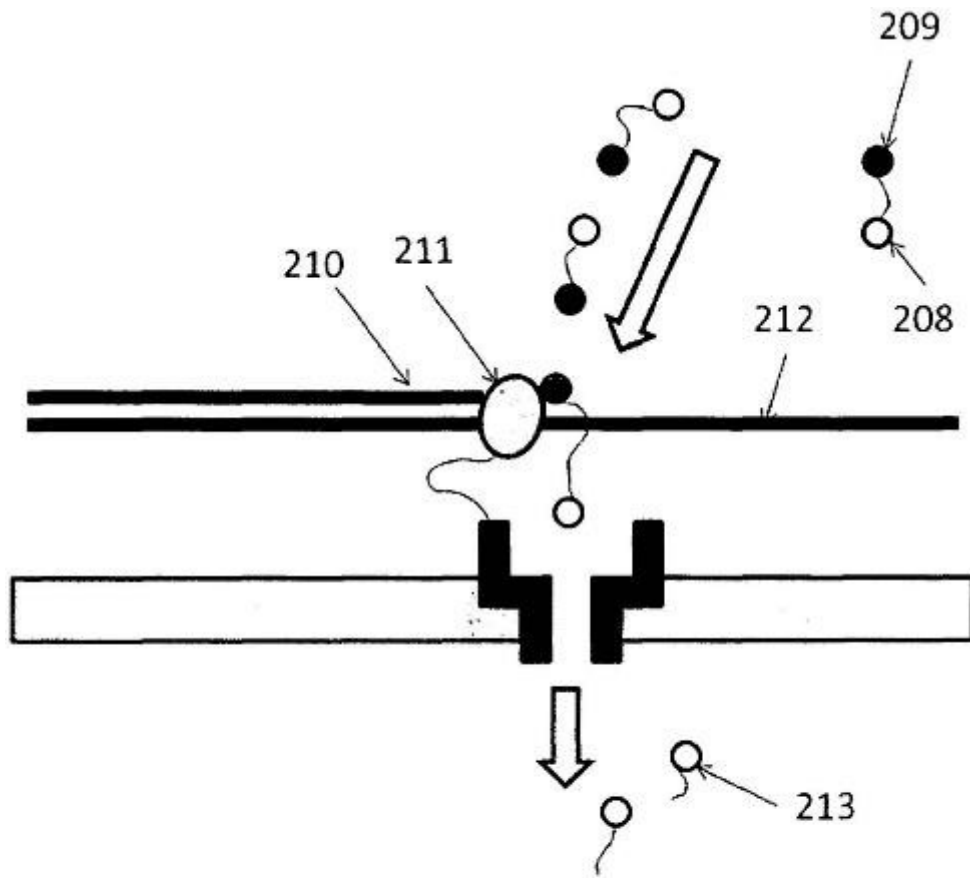


FIG. 2C

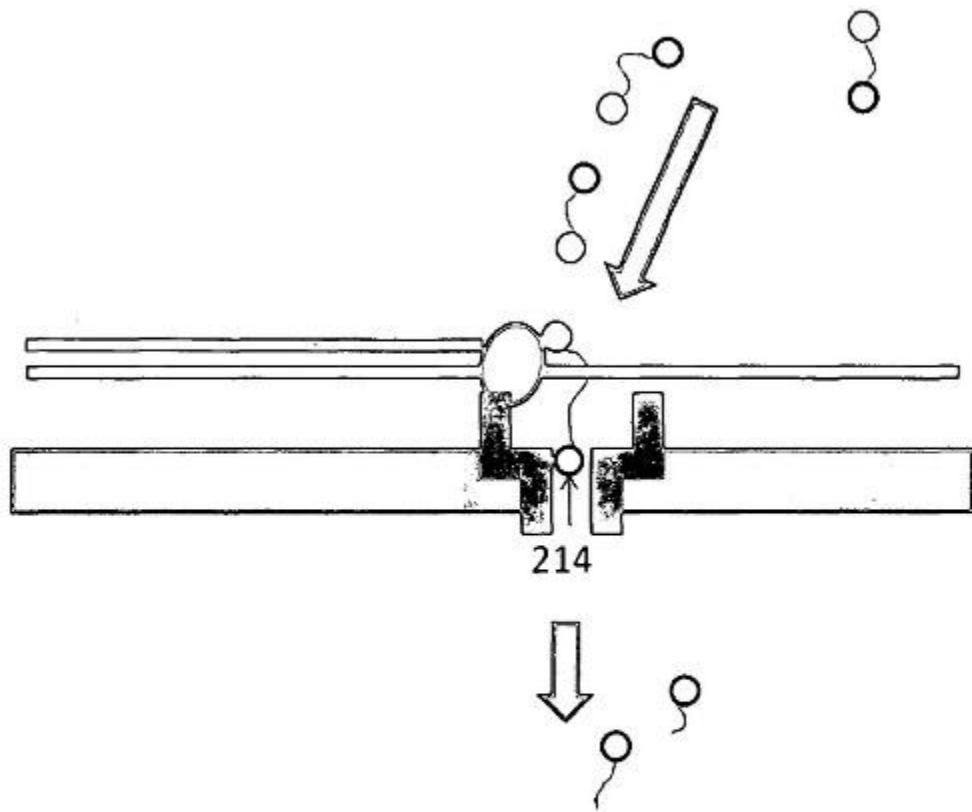


FIG. 2D

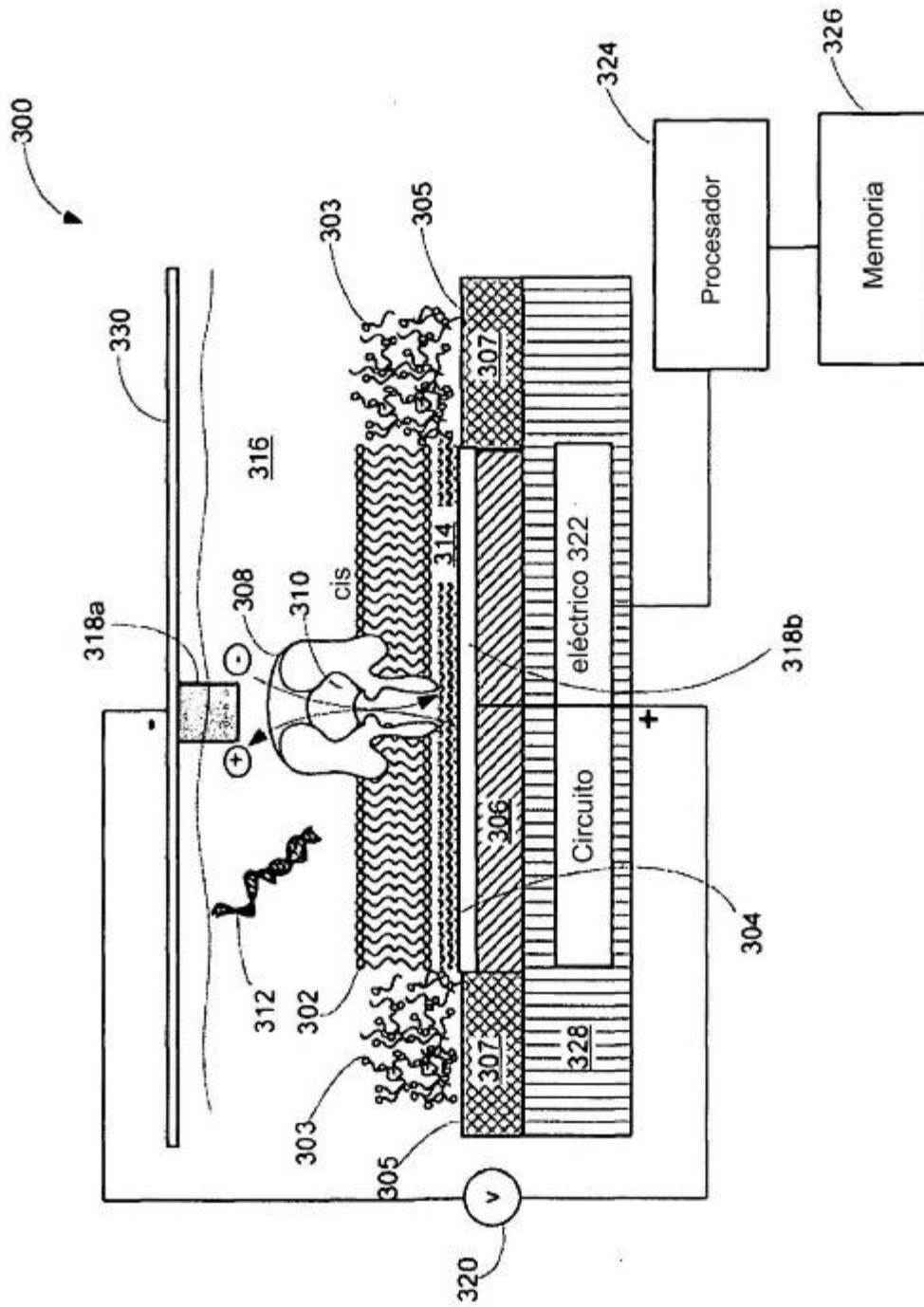


FIG. 3

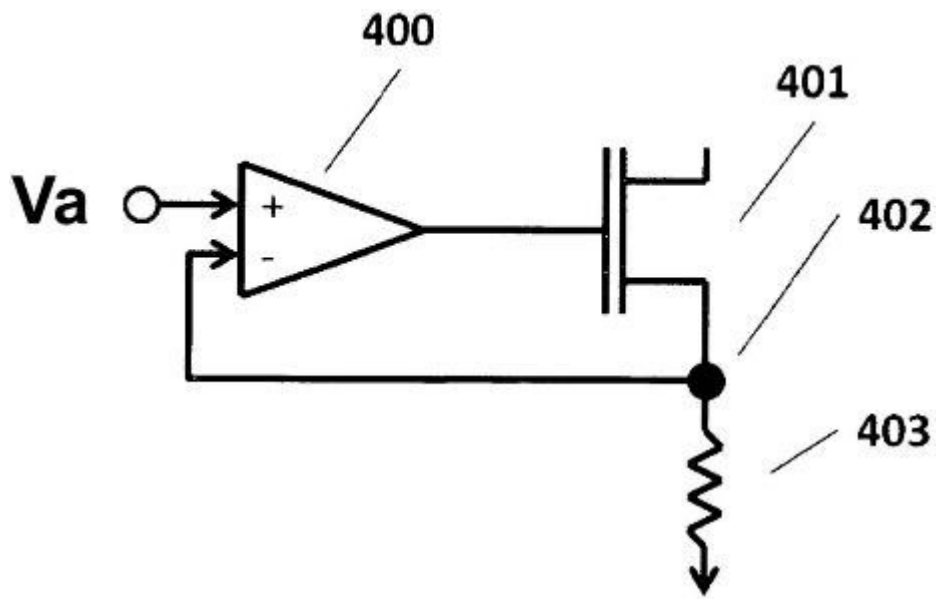


FIG. 4

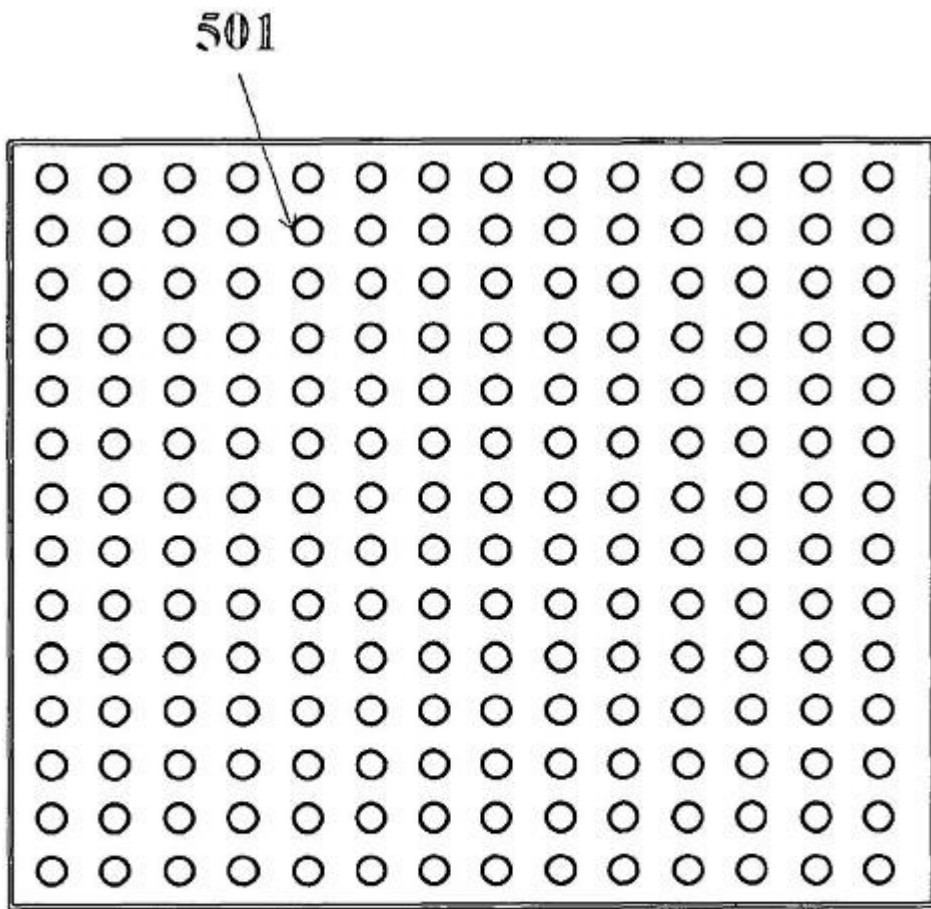


FIG. 5

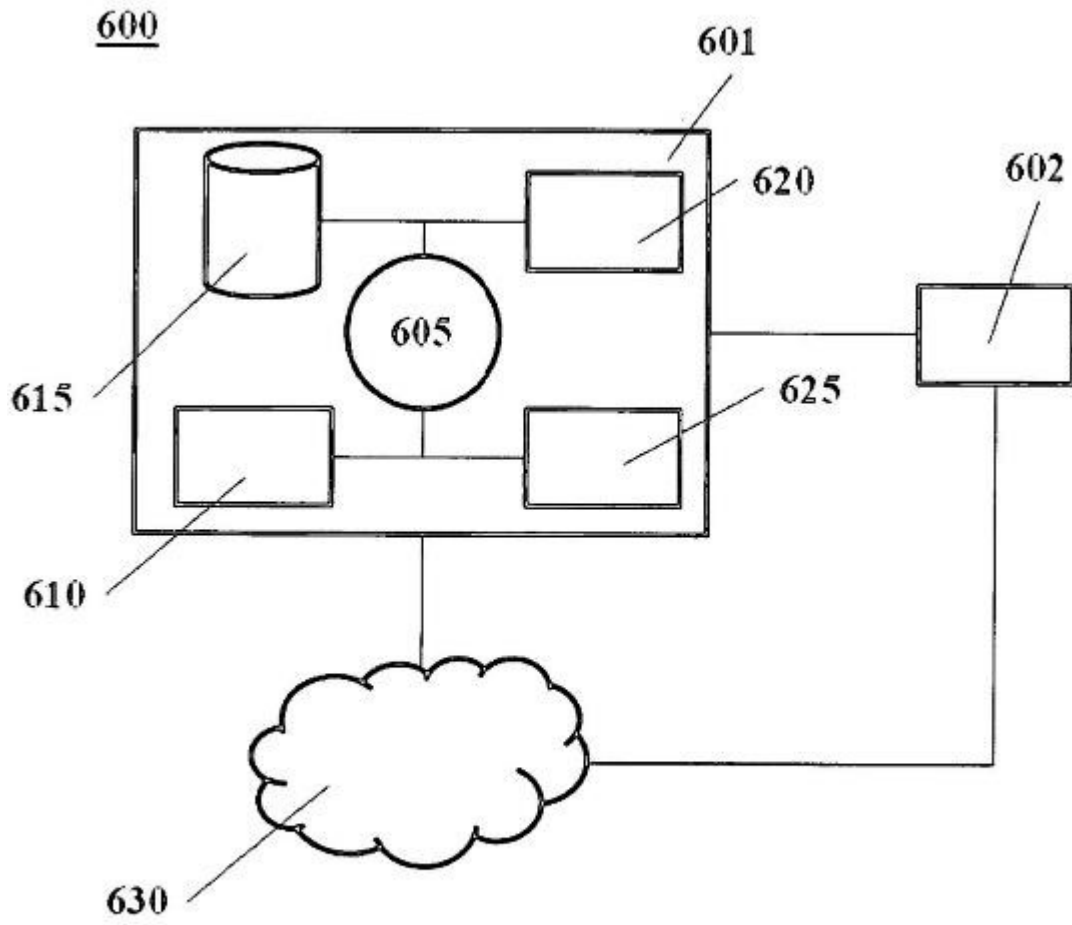


FIG. 6

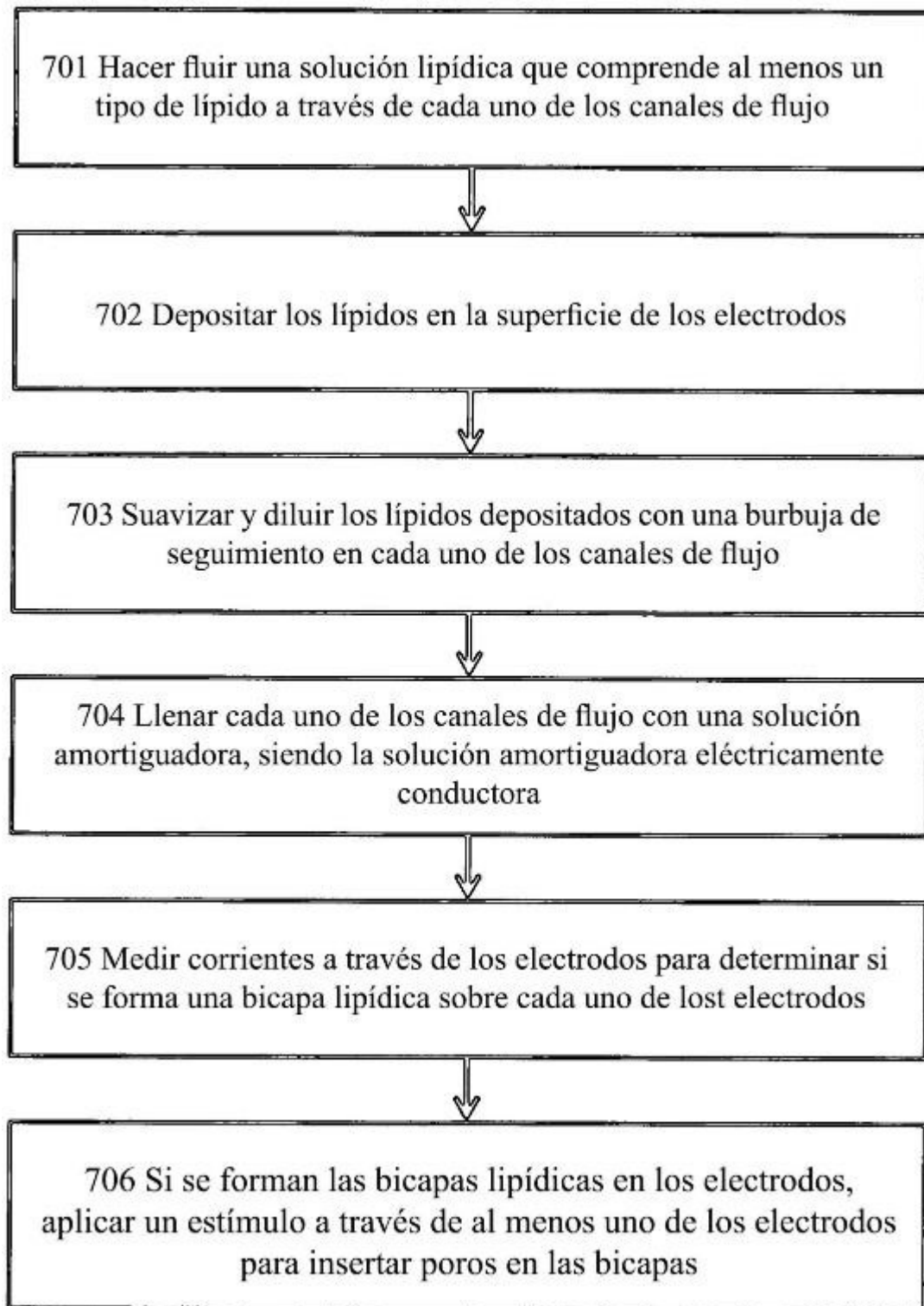


FIG. 7

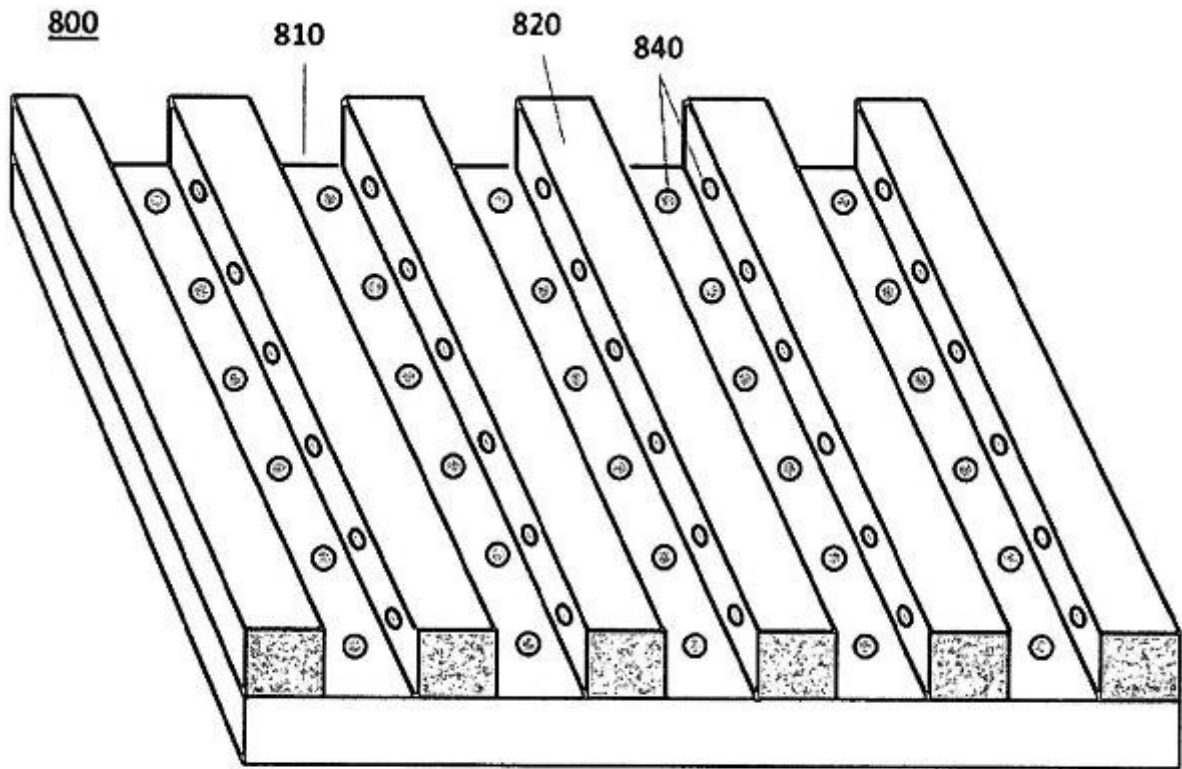


FIG. 8

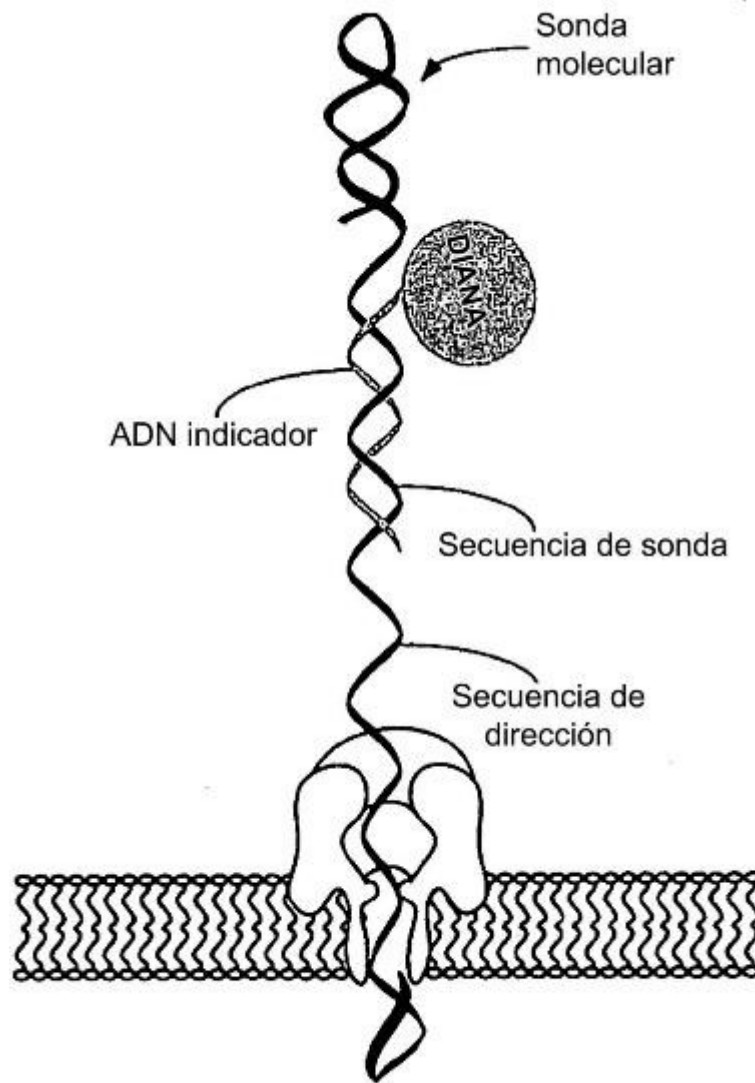


FIG. 9

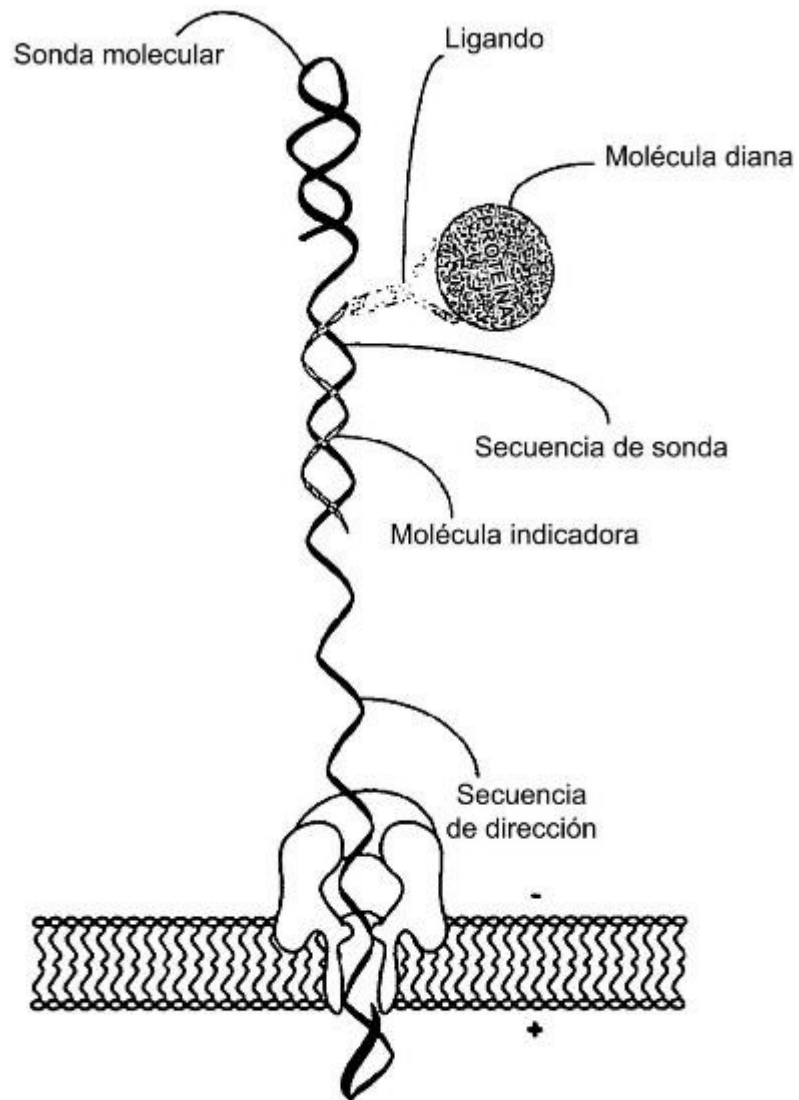


FIG. 10

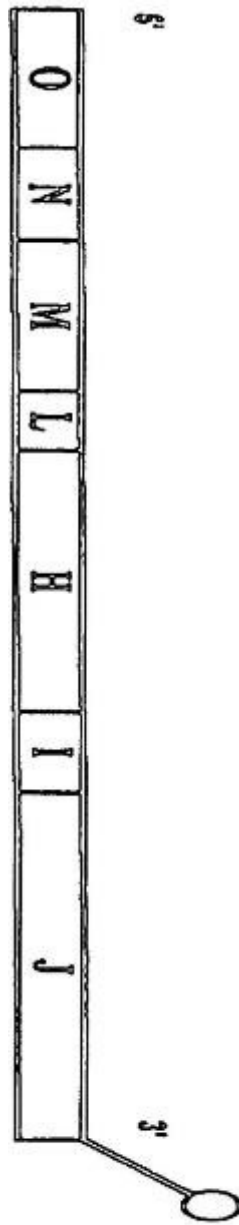


FIG. 11

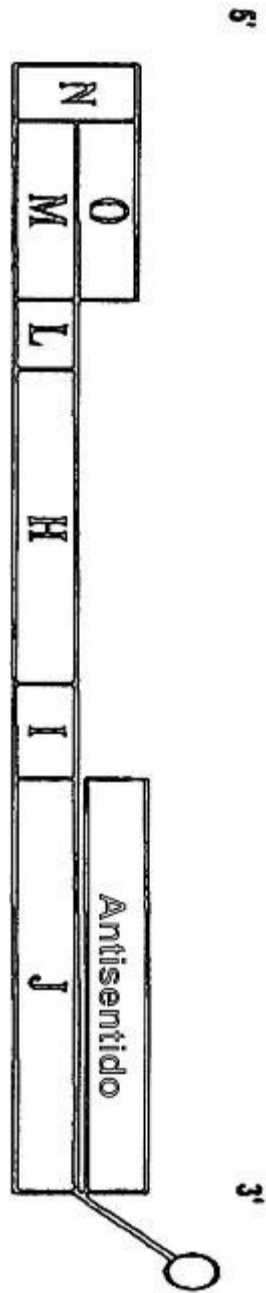


FIG. 12

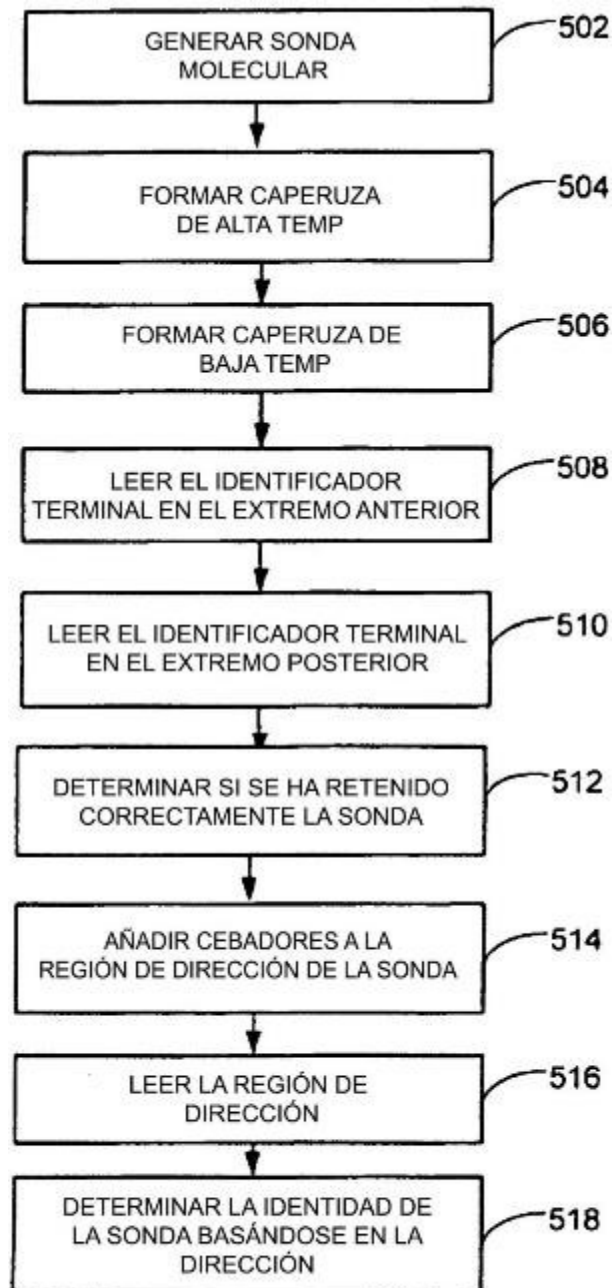


FIG. 13

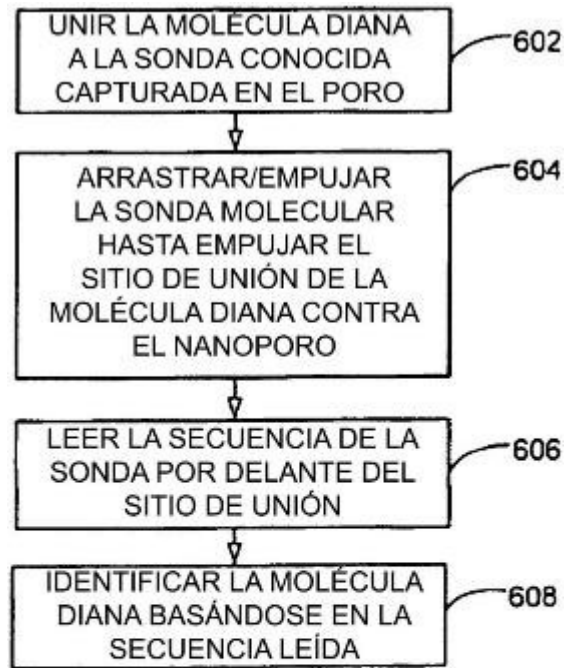


FIG. 14

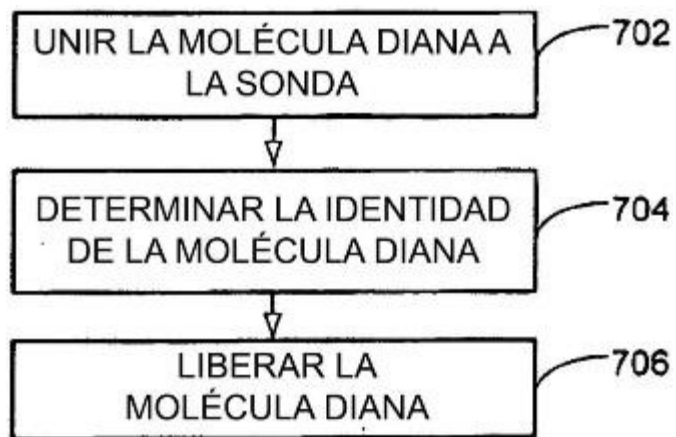


FIG. 15

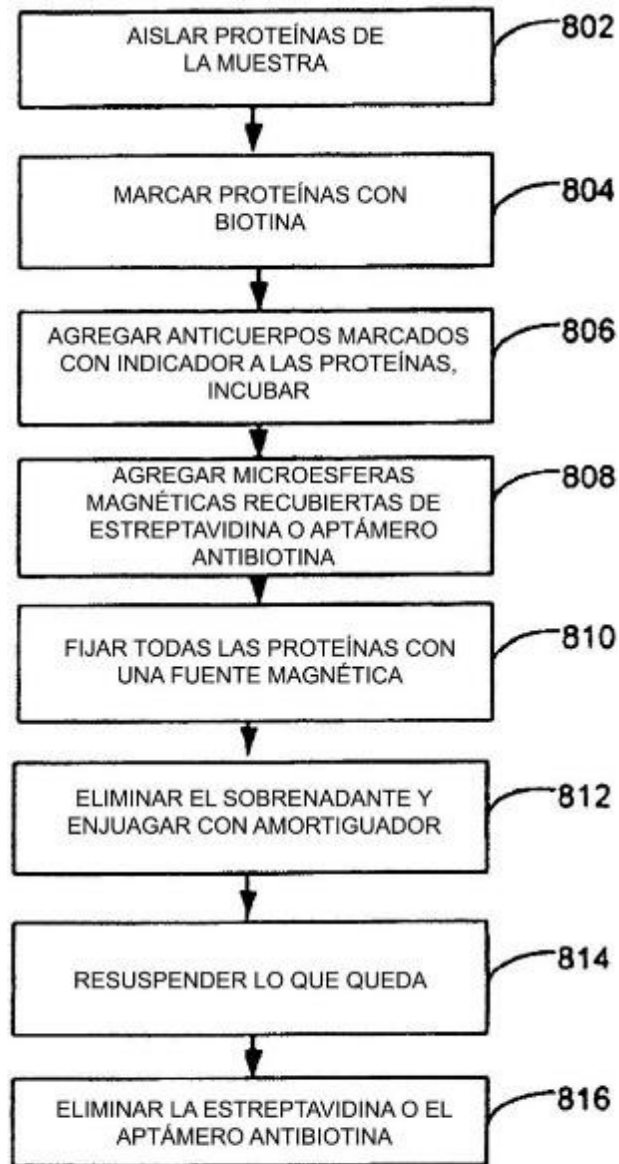


FIG. 16



FIG. 17

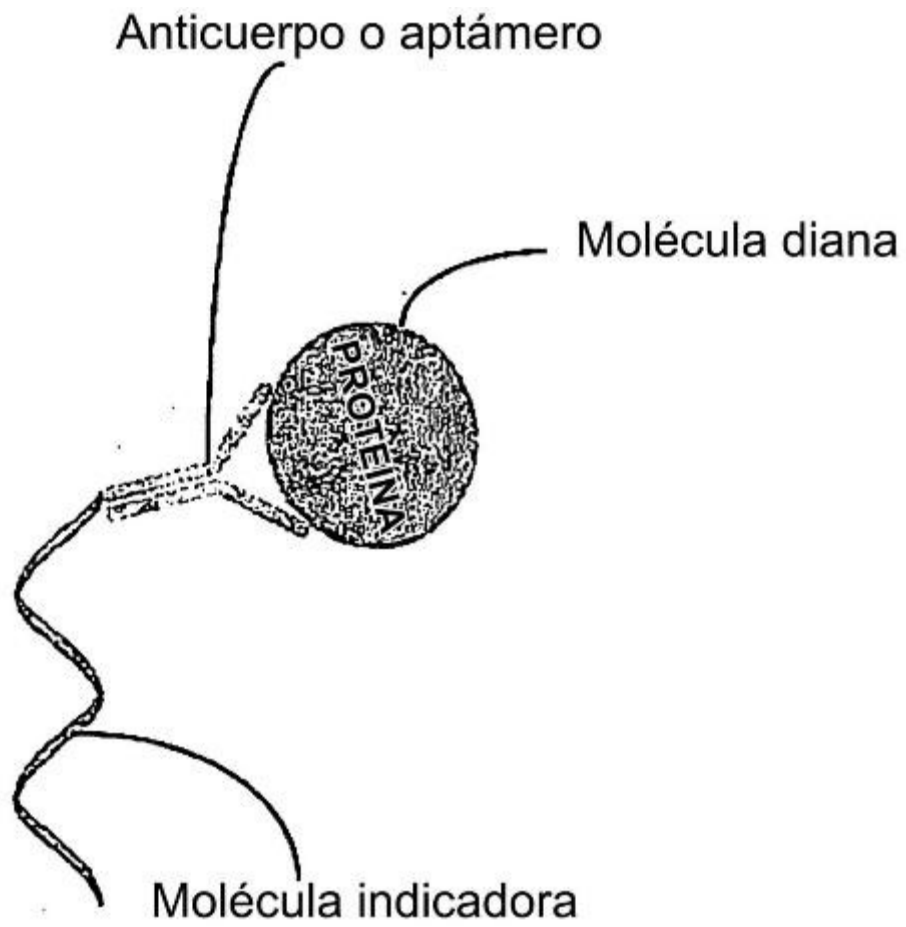


FIG. 18



FIG. 19

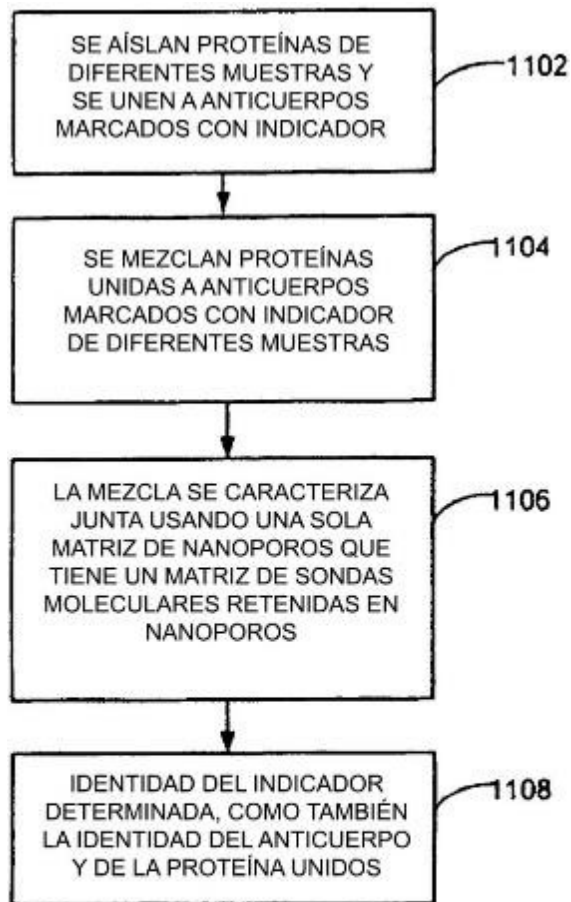


FIG. 20

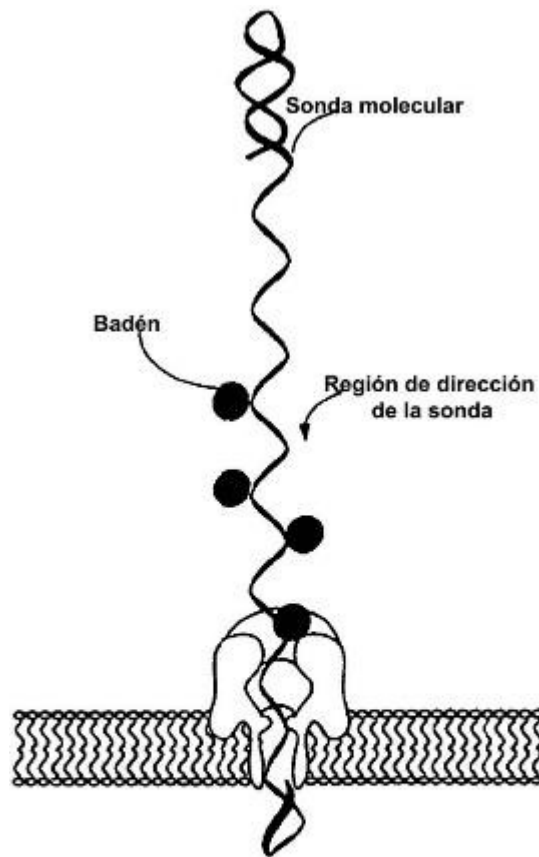
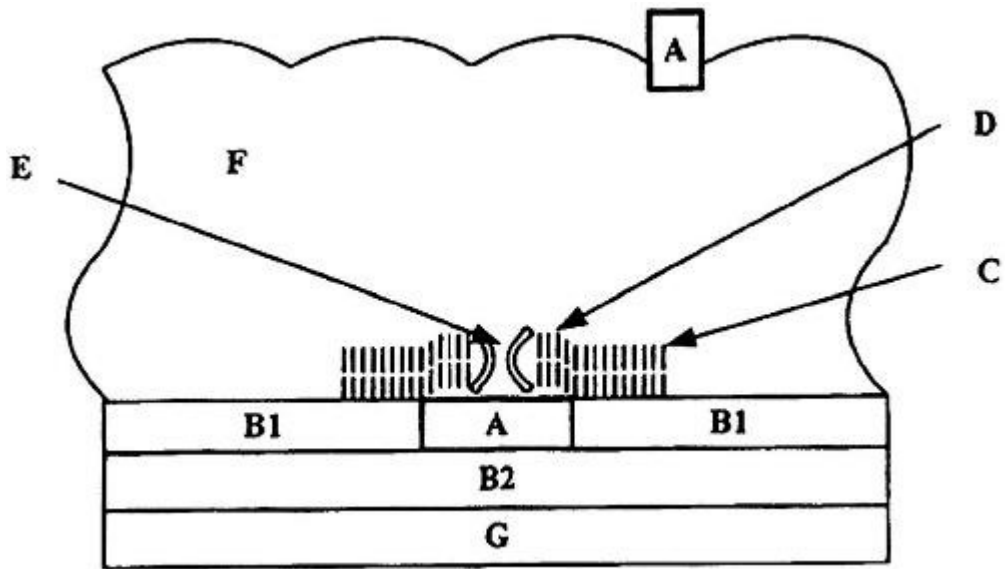


FIG. 21



- A** Electrodo
- B1** Superficie hidrófoba/lipófila
- B2** Sustrato semiconductor
- C** Disolvente/lípido
- D** Bicapa lipídica
- E** Poro
- F** Solución conductora (solución salina)
- G** Dispositivo Peltier para control electrónico de temperatura

FIG. 22

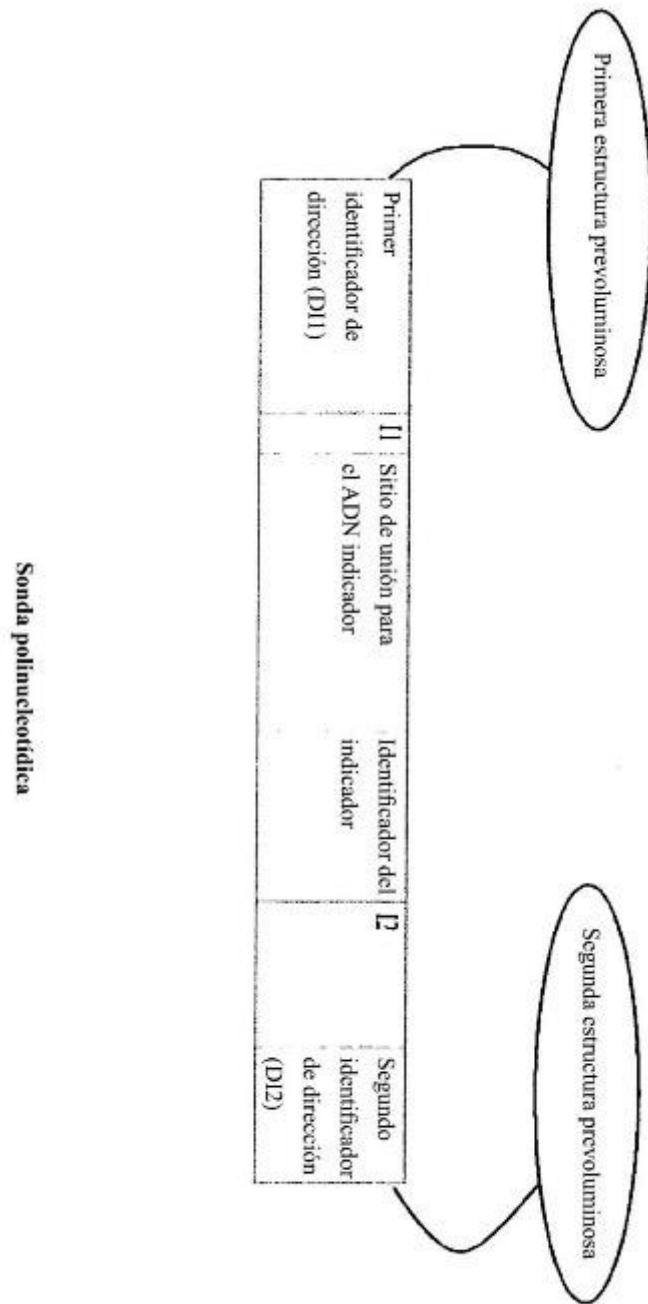


FIG. 23

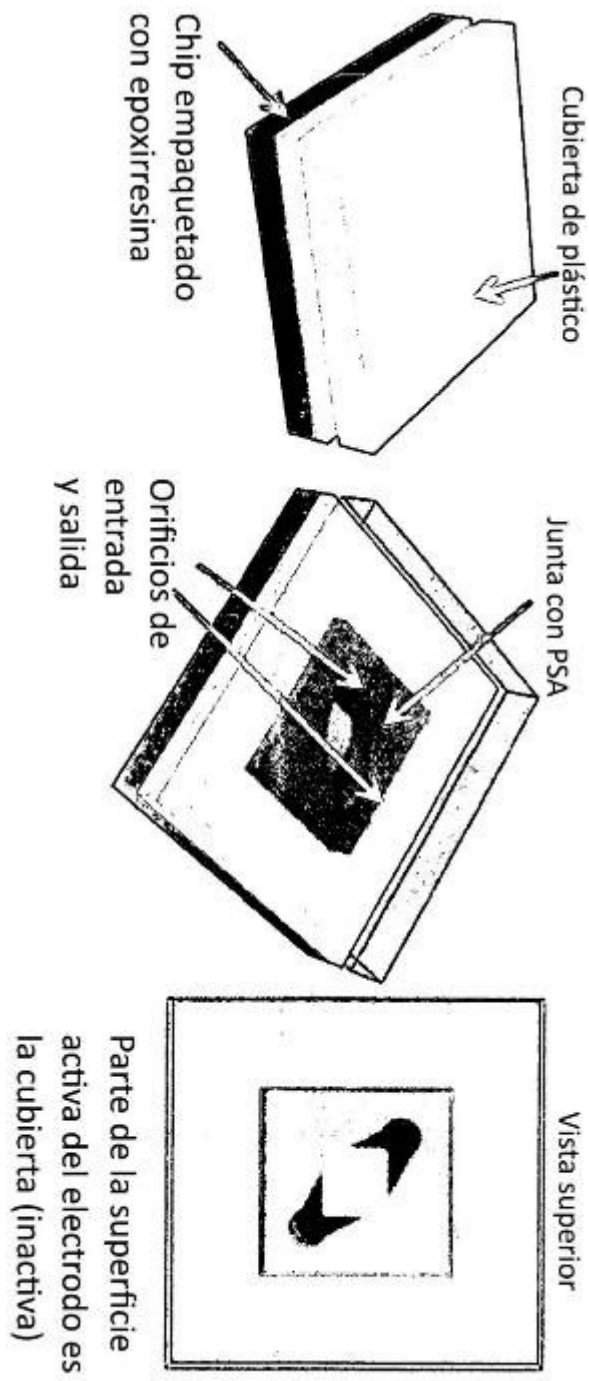
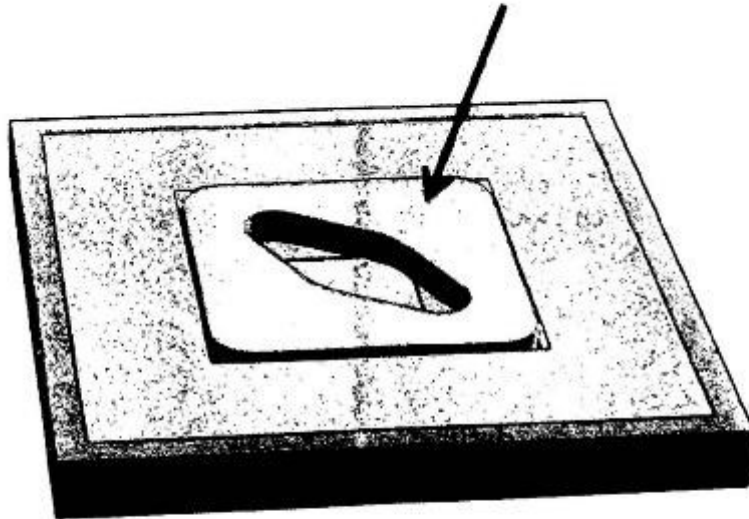


FIG. 24

Junta con PSA en ambos lados;



Chip empaquetado

FIG. 25

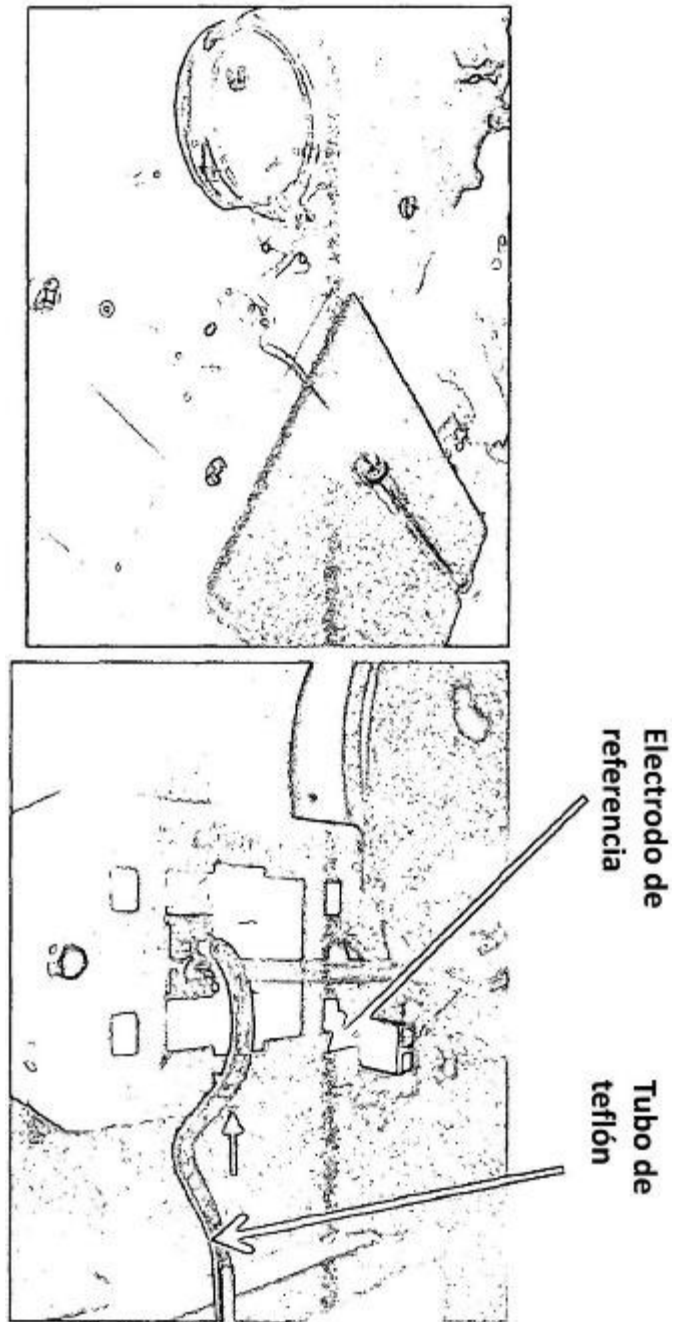


FIG. 26

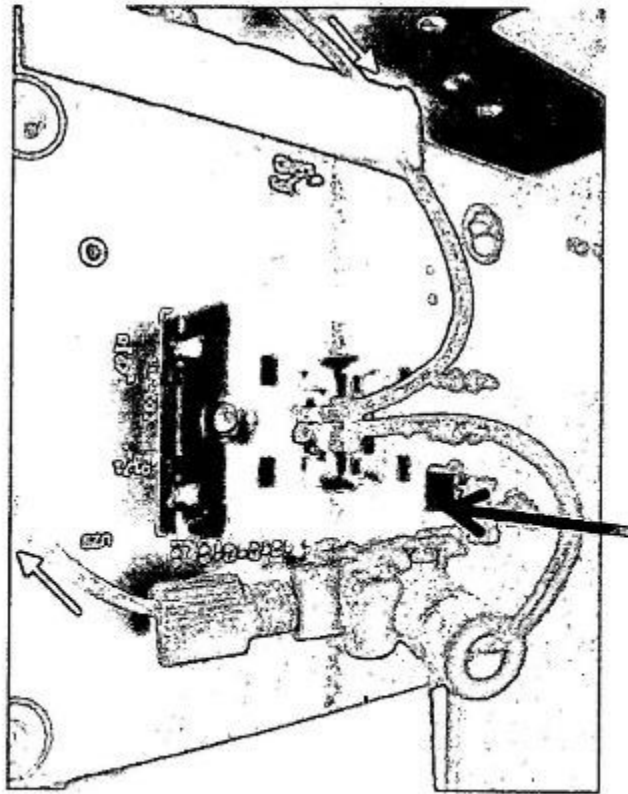
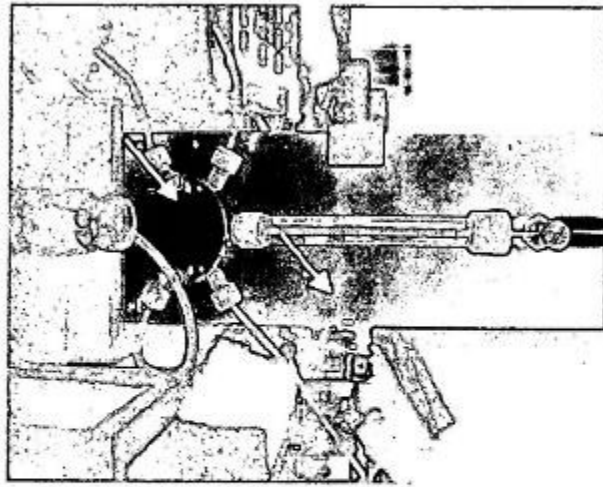


FIG. 27

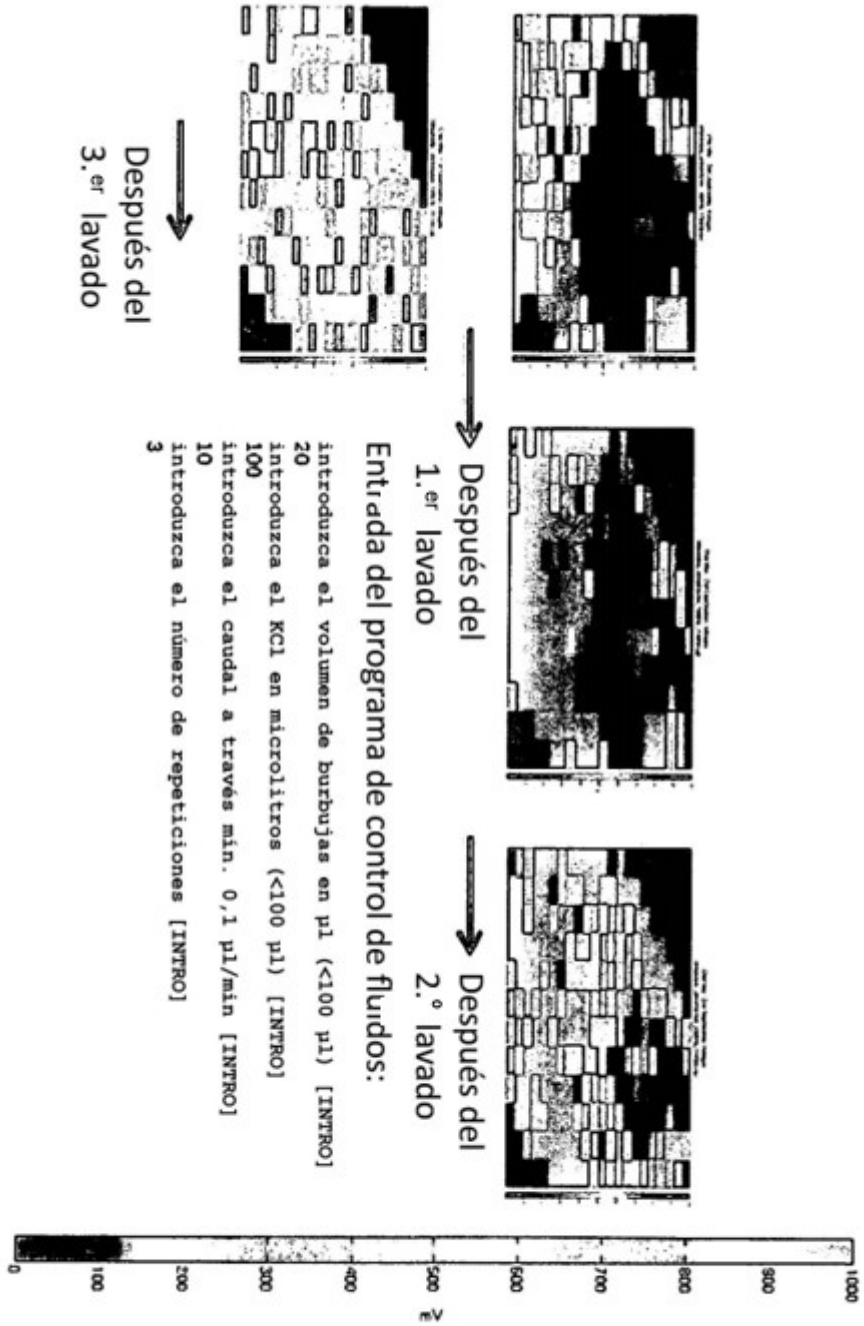


FIG. 28

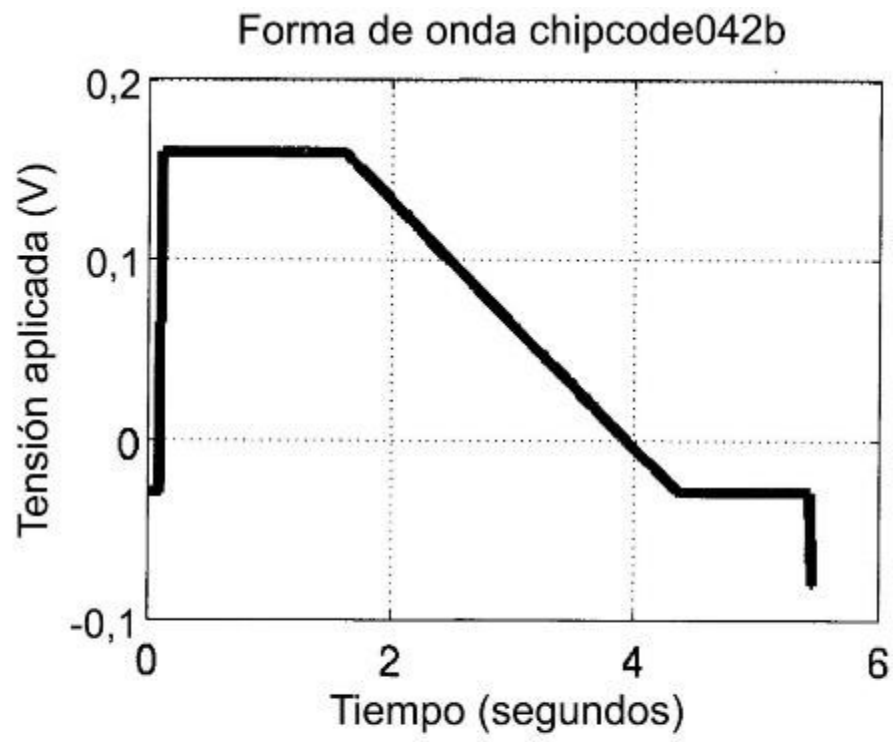


FIG. 29

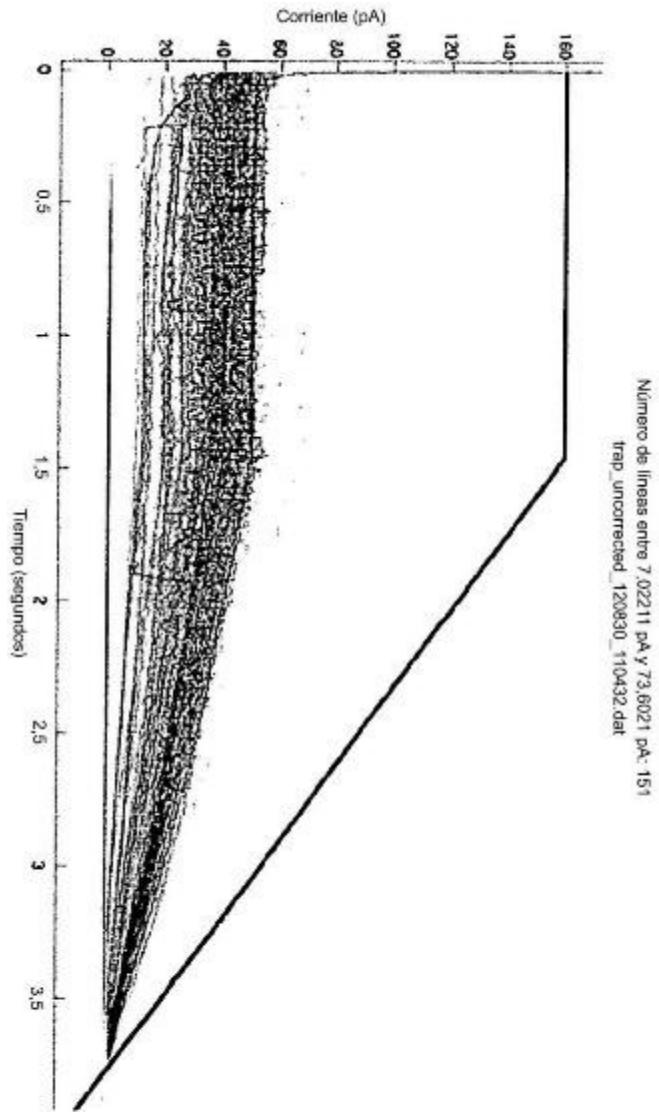


FIG. 30

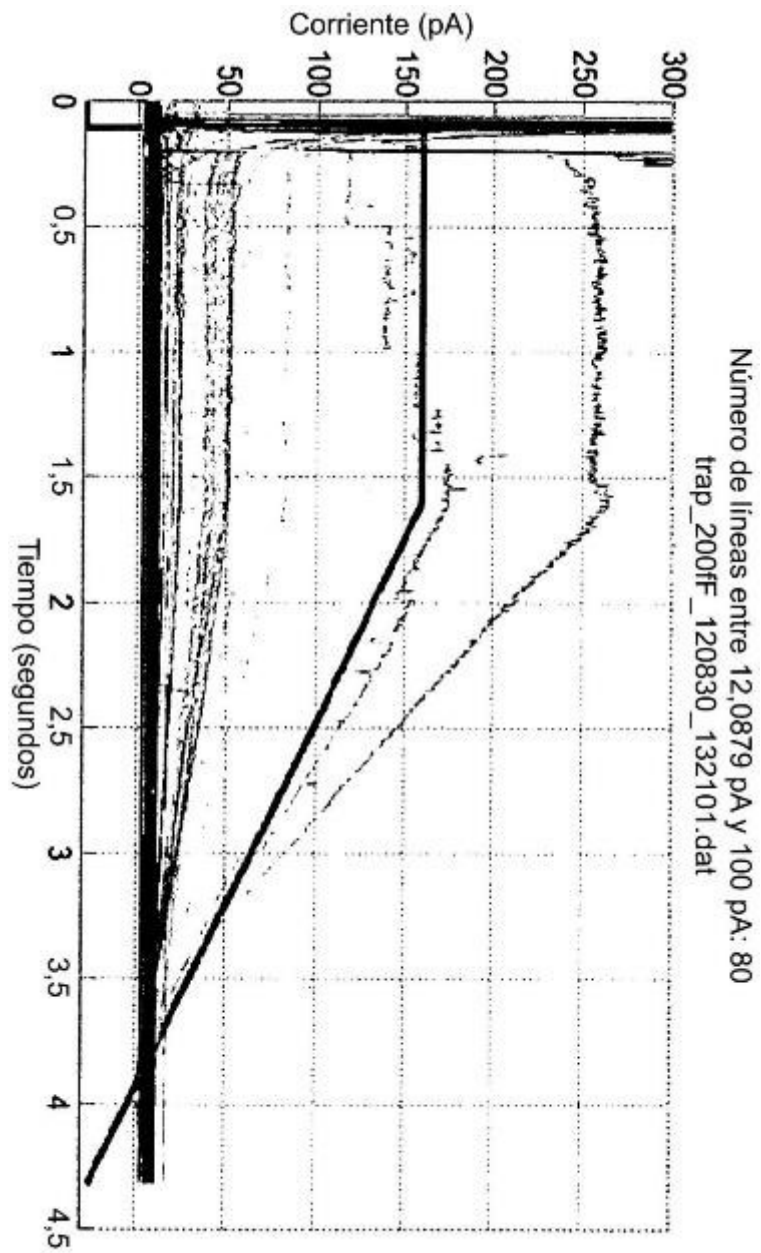


FIG. 31

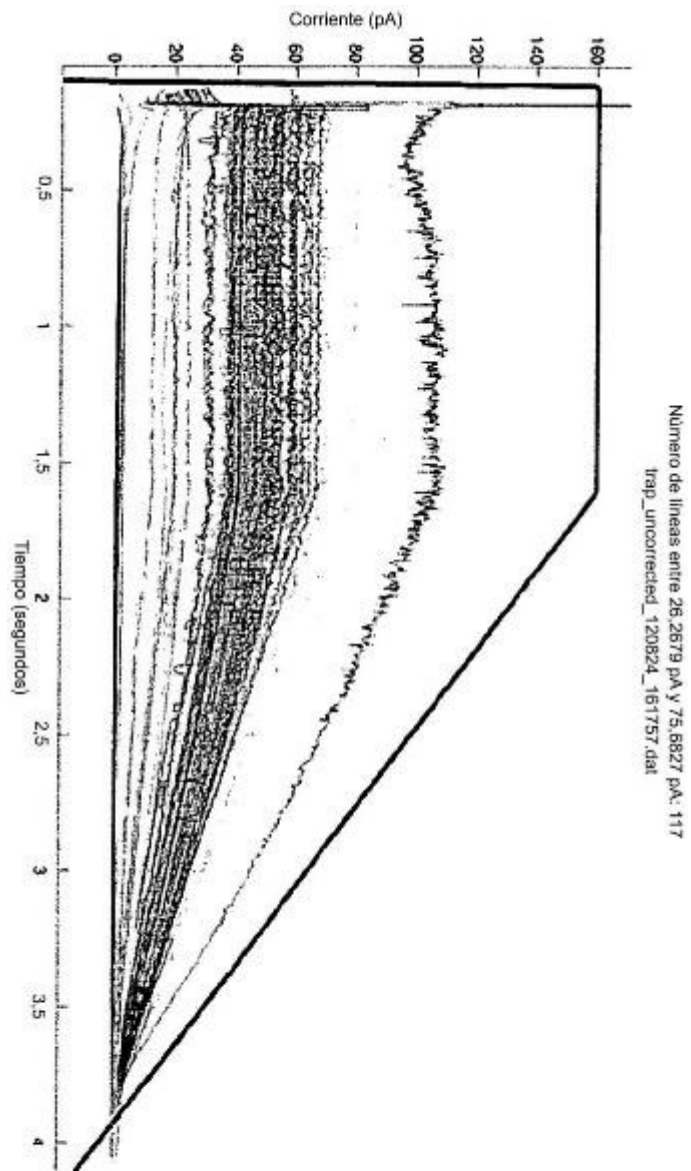


FIG. 32

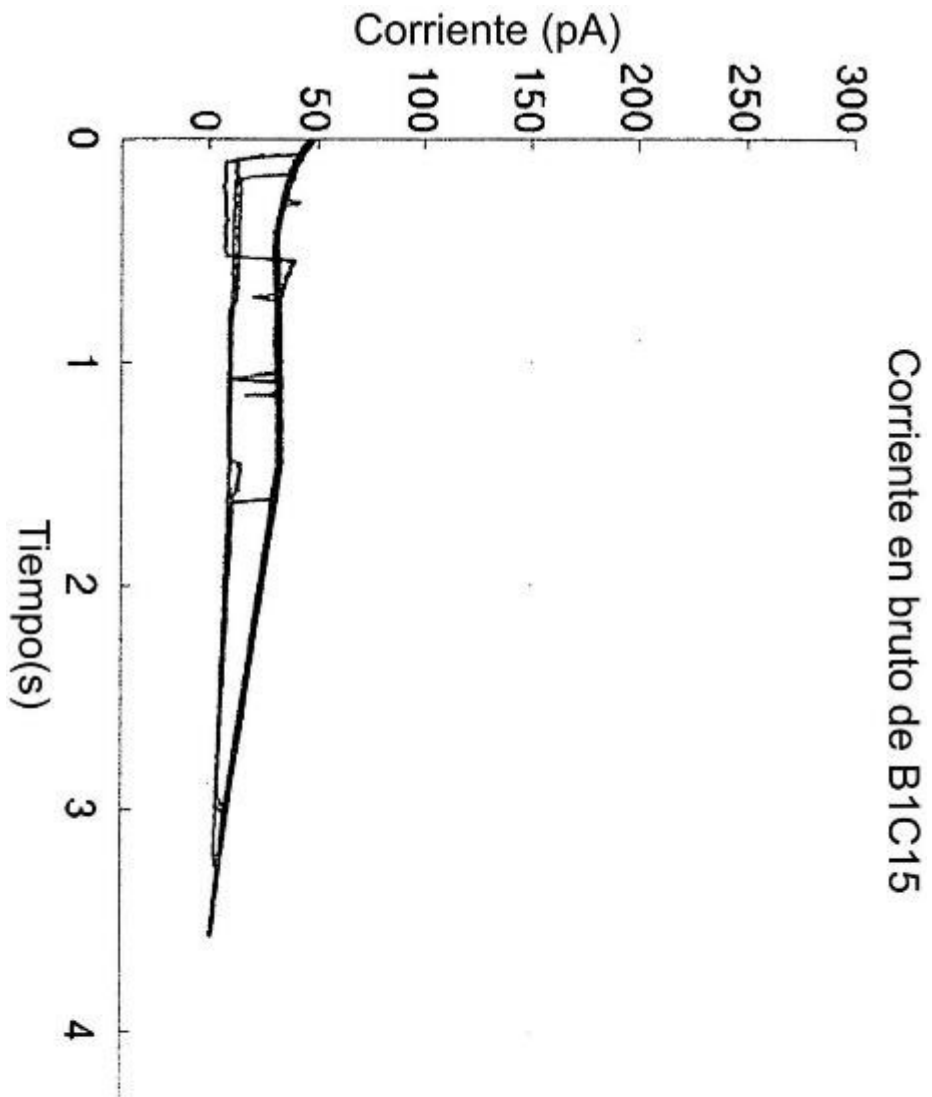


FIG. 33

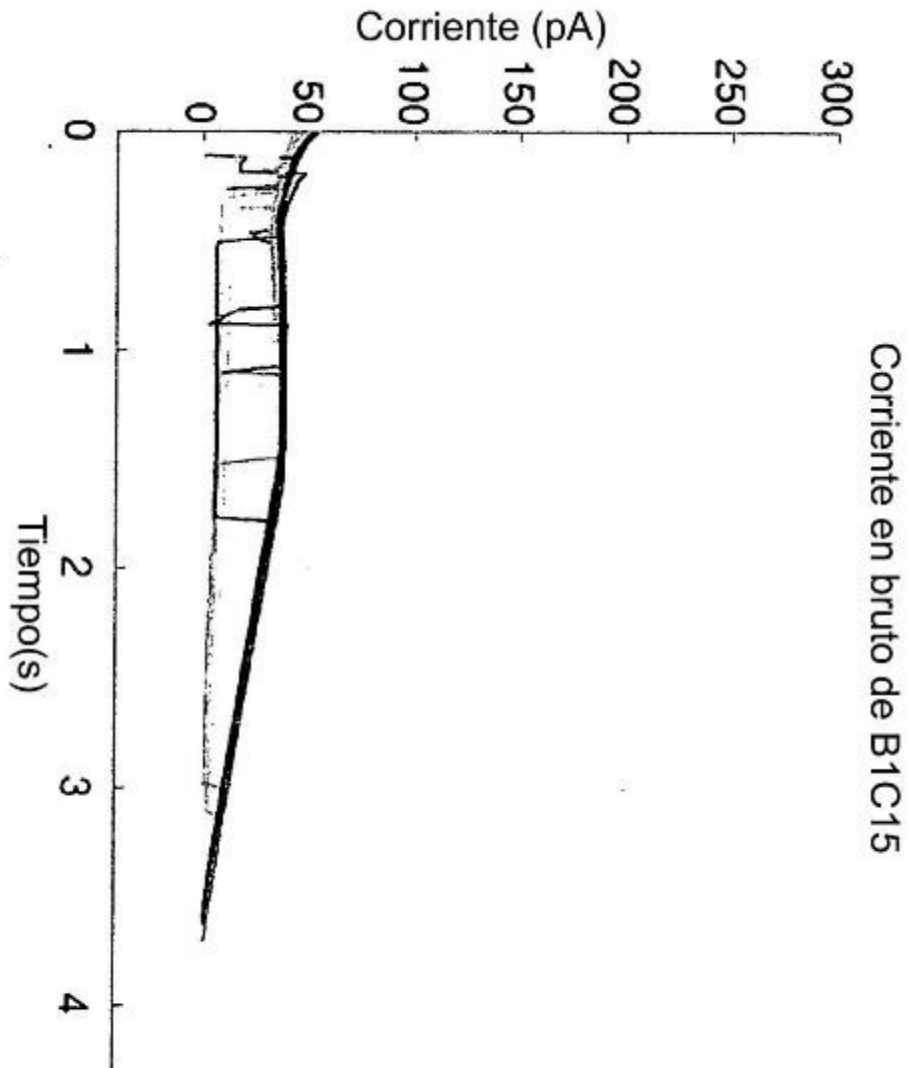


FIG. 34

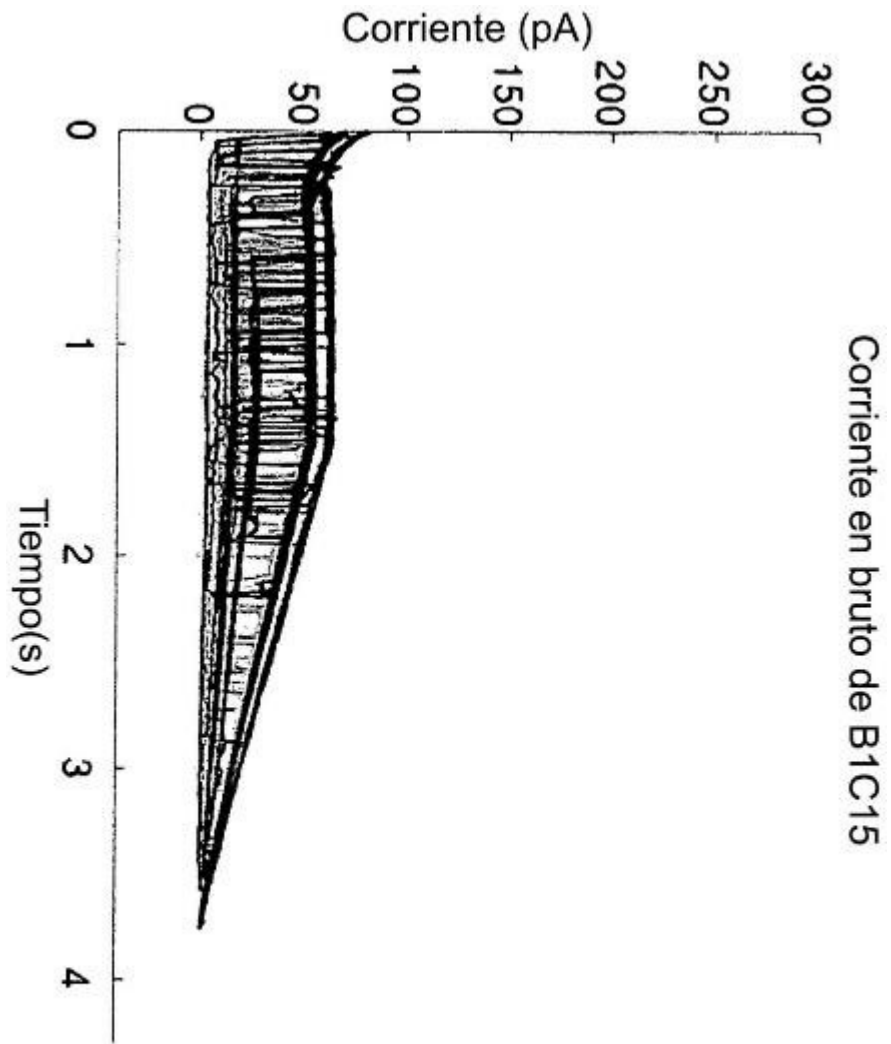


FIG. 35

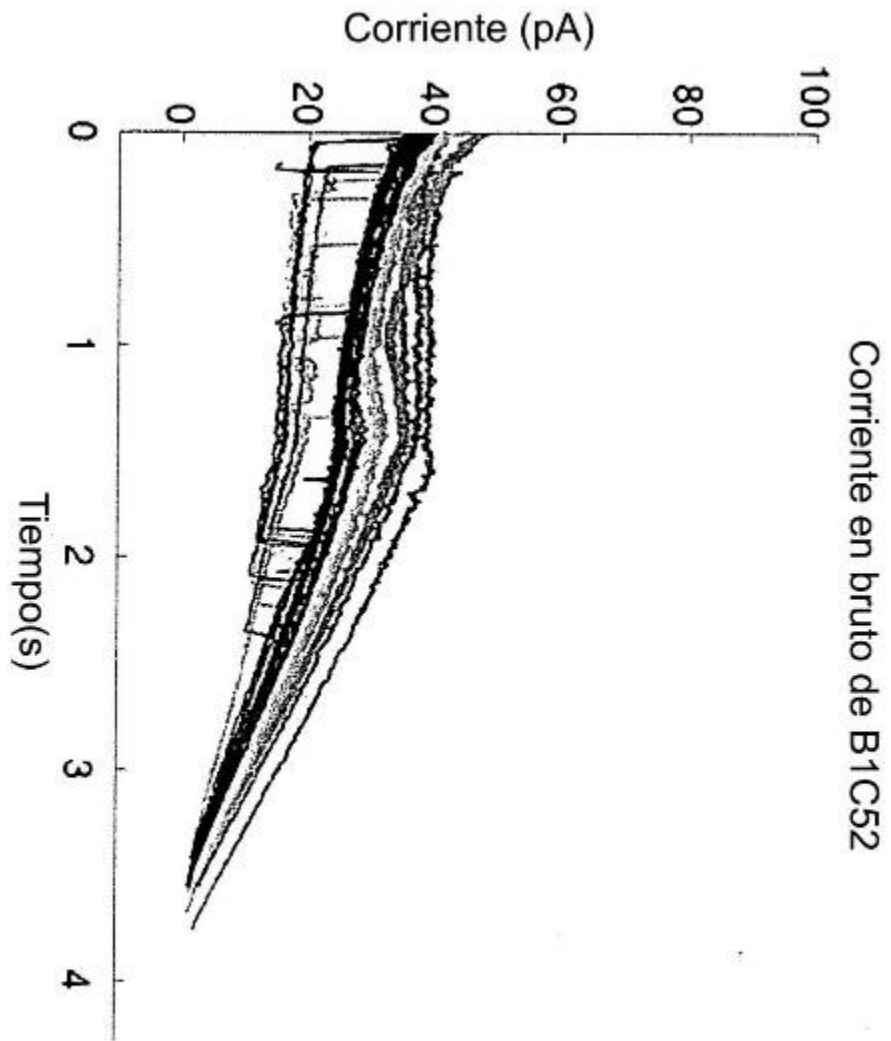


FIG. 36

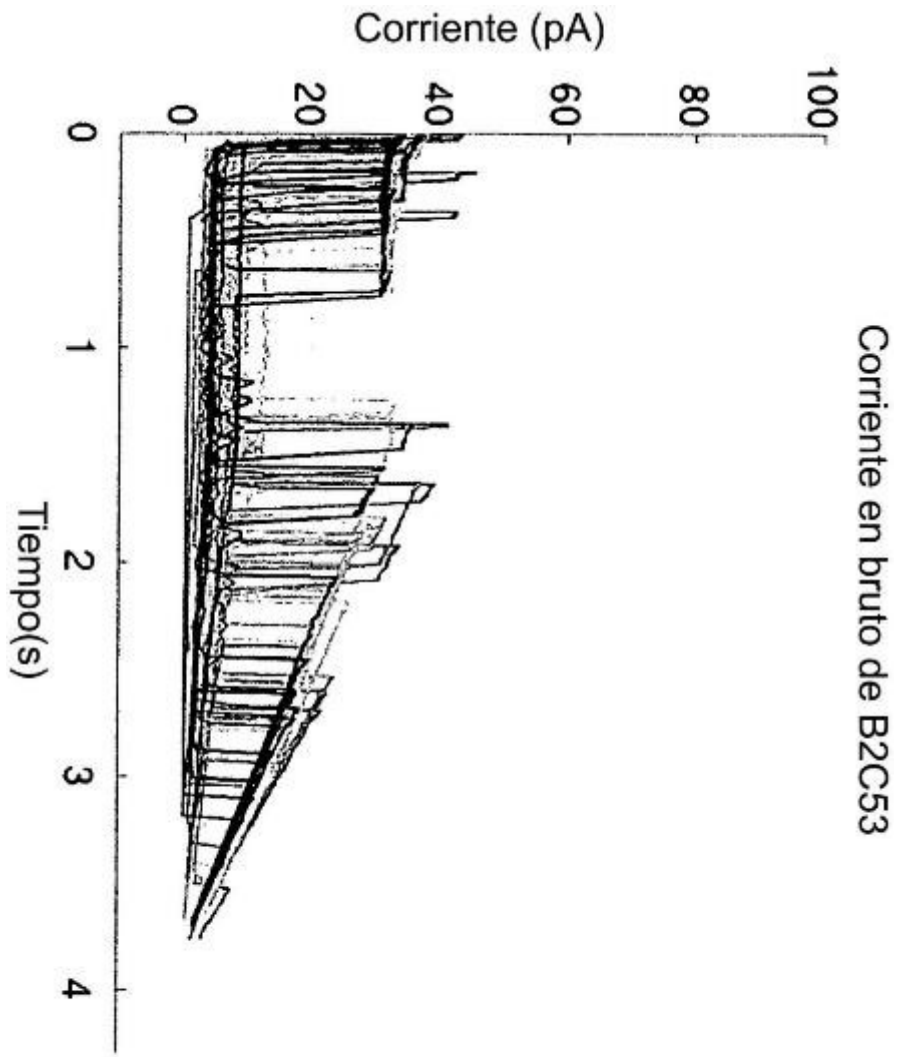


FIG. 37

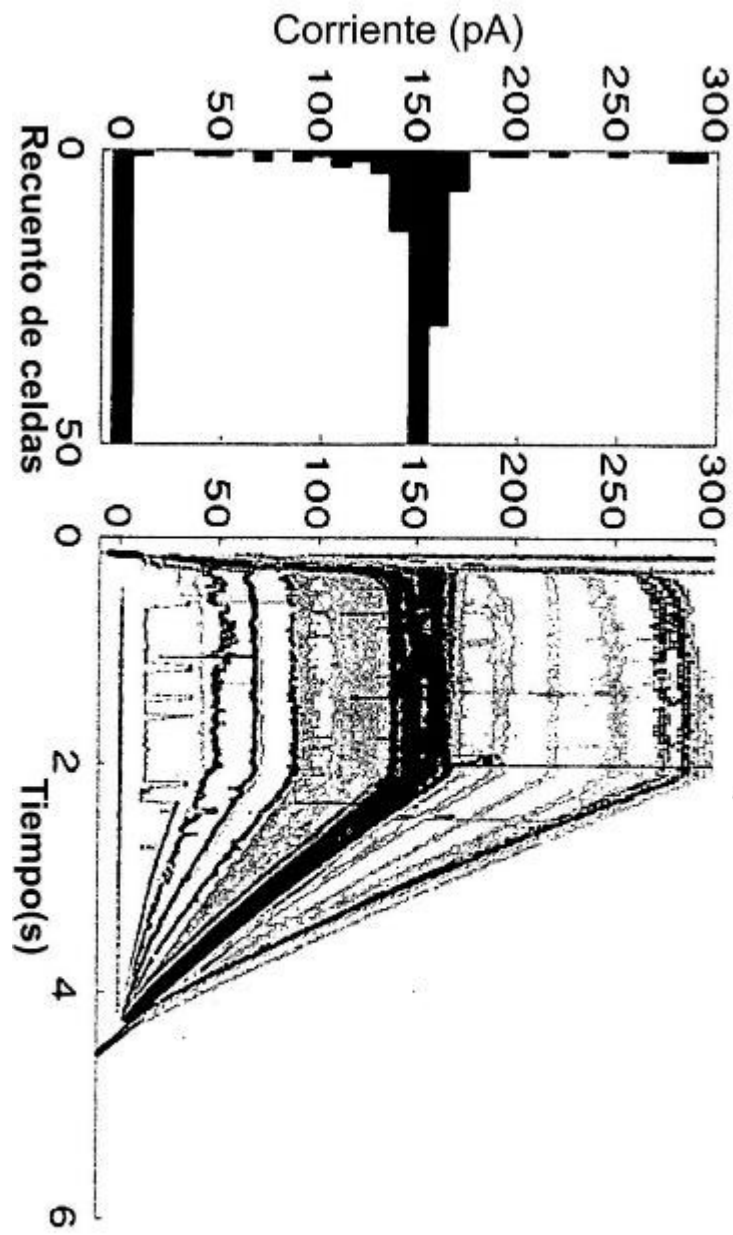


FIG. 38