

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 183**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B03C 5/00 (2006.01)

G01N 27/414 (2006.01)

B03C 5/02 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2016** E 16153373 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** EP 3170559

54 Título: **Aparato para detección de biomoléculas y su fabricación**

30 Prioridad:

23.11.2015 US 201514948835

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

22.02.2021

73 Titular/es:

**HAI KANG LIFE CORPORATION LIMITED
(100.0%)**

**Units 601-605, 6/F, Biotech Centre One, 9 Science
Park, West Avenue, Hong Kong Science Park
Shatin, New Territories Hong Kong, CN**

72 Inventor/es:

**YU, CHEUNG HOI;
JIA, BO LIANG y
LAI, CHENG CHANG**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 807 183 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aparato para detección de biomoléculas y su fabricación

La presente invención se refiere a un biochip para detectar o una secuenciación o más tipos de biomoléculas específicas en una muestra y su fabricación.

5 Antecedentes de la invención

En la actualidad, los dispositivos de detección basados en biomoleculares rápidos y de alto rendimiento tienden a ser miniaturizados y de alto nivel de integración. Un término general para tales dispositivos se llama "biochip". Un biochip se compone de un sustrato para identificar el objetivo de la solución de muestra que se dispensa sobre el sustrato. Varias partes de detección o los reactivos biomoleculares se facilitan en el sustrato dependiendo de las aplicaciones específicas. Para mejorar la eficacia de la reacción bioquímica in situ, son necesarias una distancia cercana y una concentración localmente alta del reactivo. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos para transportar y reponer activamente las moléculas objetivo, porque estos movimientos aumentarán las oportunidades para que las entidades objetivo se encuentren/reaccionen con sus contrapartes, es decir, entidades de prueba/biomoléculas, que normalmente están inmovilizadas en el sustrato. Las tecnologías de electrocinética (EK) se han desarrollado y utilizado ampliamente como una herramienta mecánica, libre de piezas, flexible y altamente programable para la manipulación de fluidos y micropartículas, especialmente en plataformas Lab-On-A-Chip (LOAC).

Actualmente, existen algunas limitaciones en la manipulación de EK en dispositivos LOAC. Bajo el régimen de campo eléctrico de CC, la tecnología de electroforesis (EP) se ha aplicado ampliamente, como la conocida electroforesis en gel. En general, el campo eléctrico de CC solo es efectivo para entidades cargadas positiva o negativamente a la vez. Para las biomoléculas que tienen conformaciones complejas y condiciones de carga, es difícil manipular el transporte de EP con buena consistencia y eficiencia. Además, incluso el electrodo altamente resistente a la corrosión, como el platino (Pt), se degradará con el tiempo de operación, lo que también afectaría la precisión y la eficiencia de dichos dispositivos. Cuando se utiliza el campo eléctrico de CA, la dielectroforesis (DEP) se ha convertido en una tecnología sobresaliente para manipular cualquier micropartícula cargada y neutra. El principal inconveniente de DEP es el corto alcance efectivo, mientras que otros efectos electrohidrodinámicos de CA (EHD) han demostrado ser capaces de conducir fluidos a mayor distancia. Sin embargo, el flujo de fluido no es eficiente para confinar y concentrar moléculas pequeñas como los ácidos nucleicos.

En una realización adicional, el electrodo comprende una franja alargada de material conductor eléctrico.

Por lo tanto, buscamos proporcionar una solución completa y sólida para aumentar la eficiencia de la reacción bioquímica a través del diseño conceptual de estructuras de dispositivos y el método de fabricación para manipulaciones EK combinacionales.

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a un biochip de acuerdo con la reivindicación 1.

En una realización, el surco separa los dos o más electrodos.

35 Preferiblemente, el electrodo se deposita debajo de la capa dieléctrica.

Preferiblemente, el electrodo tiene una anchura predeterminada de aproximadamente 10 nm a 1 mm.

Más preferiblemente, el electrodo tiene un espesor predeterminado de aproximadamente 1 nm a 1 mm.

Aún más preferiblemente, la capa de dieléctrico tiene un espesor de aproximadamente 1 nm a 1 mm.

40 Es preferible que cada pozo tiene una anchura predeterminada de aproximadamente 10 nm a 1 mm y tiene que ser menor que la anchura predeterminada del electrodo como se describió anteriormente.

Es ventajoso que cada pozo tenga una profundidad predeterminada de aproximadamente 1 nm a 1 mm y tiene que ser menor que el espesor de la capa dieléctrica como se describió anteriormente.

Preferiblemente, el surco tiene una predeterminada anchura mayor que dos veces el espesor de la capa dieléctrica como se describió anteriormente y menor o igual a la anchura del electrodo como se describió anteriormente.

45 Preferiblemente, la capa dieléctrica comprende un material dieléctrico seleccionado de un grupo que consiste en óxido de silicio, nitruro de silicio, óxido de aluminio y óxido de titanio.

Más preferiblemente, el elemento de base comprende una capa de óxido térmico depositado sobre una capa de sustrato de silicio.

Aún más preferiblemente, una o más entidades de la sonda están unidas a la superficie de operación en las cavidades para la restauración el uso de un campo eléctrico de baja frecuencia para crear un gradiente de campo que atrae las entidades de destino hacia la cavidad.

5 Es preferible que una o más entidades de la sonda estén unidas a la superficie de operación y fuera de las cavidades para restaurar el uso de un campo eléctrico de alta frecuencia para crear un gradiente de campo que dirige las entidades objetivo hacia la superficie de operación fuera de la cavidad.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de fabricación del biochip como se describió anteriormente de acuerdo con las reivindicaciones 11, 12 y 13.

Breve descripción de los dibujos

10 La invención se describirá ahora más particularmente, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1A es una vista en perspectiva del biochip de acuerdo con la invención;

La Figura 1B es una representación esquemática en sección transversal del biochip en la Figura 1A;

15 La Figura 2 es una vista lateral esquemática de parte del biochip de la Figura 1A que muestra una cavidad con entidades de sonda unidas a la misma en una superficie de operación y un electrodo;

La Figura 3 es una representación esquemática de una parte del biochip en la Figura 1A con indicaciones que muestran un transporte de fluidos de largo alcance y un transporte de fluidos de corto alcance o regulación localizada;

20 Las Figuras 4A a 4D son representaciones esquemáticas de una operación EK de una cavidad circular en el biochip de la figura 1A. Específicamente, la Figura 4A muestra el receso circular sin operación EK, la Figura 4B muestra la operación EK de la cavidad circular bajo un campo eléctrico de CA de baja frecuencia que se aplica a través de los electrodos del biochip, se proporcionan indicaciones para mostrar la dirección del transporte de fluido a larga distancia y el transporte de fluido de corto alcance o la regulación localizada, la Figura 4C muestra la operación EK bajo una frecuencia media de campo eléctrico de CA aplicado a través de los electrodos del biochip, se proporcionan indicaciones que muestran la dirección del transporte de fluido de largo alcance y el transporte de fluido de corto alcance o regulación localizada, la Figura 4D muestra la operación EK bajo una alta frecuencia de campo eléctrico de CA aplicado a través de los electrodos del biochip, se proporcionan indicaciones para mostrar la dirección del transporte de fluido de largo alcance y el transporte de fluido de corto alcance o regulación localizada;

30 La Figura 5 es una comparación ilustrativa esquemática entre la unión de las entidades objetivo y la sonda a través de difusión pasiva y a través del transporte electrocinéticamente mejorado;

La Figura 6 es una ilustración esquemática de una primera realización de un proceso de fabricación del biochip en la Figura 1A;

35 La Figura 7 es una ilustración esquemática de una segunda realización del proceso de fabricación del biochip en la Figura 1A;

La Figura 8 es una ilustración esquemática de una tercera realización del proceso de fabricación del biochip en la Figura 1A;

La Figura 9A es una ilustración esquemática de la conexión eléctrica del biochip en la Figura 1A;

40 La Figura 9B es una ilustración fotográfica del biochip en la Figura 9A que muestra la distribución de entidades objetivo suspendidas en el biochip a diferentes frecuencias de campo eléctrico aplicado a través de los electrodos;

La Figura 10 es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, en un medio en el biochip bajo un campo eléctrico de CA a una frecuencia de 1 kHz;

45 La Figura 11A es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, alrededor de la cavidad en el biochip en un medio de baja conductividad bajo un campo eléctrico de CA de baja frecuencia a 1 kHz;

50 La Figura 11B es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, alrededor de una región de separación entre dos cavidades en el biochip de la Figura 11A en un medio de baja conductividad bajo un campo eléctrico de CA de baja frecuencia a 1 kHz ;

La Figura 12A es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, alrededor de la cavidad en el biochip en un medio de baja conductividad bajo un campo eléctrico de CA de frecuencia media a 10 kHz;

5 La Figura 12B es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, alrededor de una región de espacio entre dos cavidades en el biochip de la Figura 12A en un medio de baja conductividad bajo un campo eléctrico de CA de frecuencia media a 10 kHz ;

10 La Figura 13A es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, alrededor de la cavidad en el biochip en un medio de baja conductividad bajo un campo eléctrico de CA de alta frecuencia de 1 MHz;

La Figura 13B es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, alrededor de una región de separación entre dos cavidades en el biochip de la Figura 13A en un medio de baja conductividad bajo un campo eléctrico de CA de alta frecuencia de 1 MHz ;

15 La Figura 14A es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, alrededor de la cavidad en el biochip en un medio de alta conductividad bajo un campo eléctrico de CA de baja frecuencia de 1 kHz;

20 La Figura 14B es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, alrededor de una región de espacio entre dos cavidades en el biochip de la Figura 14A en un medio de alta conductividad bajo un campo eléctrico de CA de baja frecuencia de 1 kHz ;

La Figura 15A es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, alrededor de la cavidad en el biochip en un medio de alta conductividad bajo un campo eléctrico de CA de alta frecuencia de 1 MHz;

25 La Figura 15B es una ilustración esquemática de la distribución del campo eléctrico y la dirección de la fuerza DEP, mostrada por flechas, en un área alrededor de una región de separación entre dos cavidades en el biochip de la Figura 15A en un medio de alta conductividad bajo un campo eléctrico de CA de alta frecuencia de 1 MHz;

30 La Figura 16 es una ilustración fotográfica de una parte del biochip en la Figura 1 que demuestra una comparación entre la concentración del objetivo unido para sondear biomoléculas bajo difusión pasiva y la concentración del objetivo unido para sondear biomoléculas bajo transporte electrocinéticamente mejorado durante un mismo período de tiempo;

La Figura 17 muestra el patrón de las biomoléculas de la sonda inmovilizada y el significado de las biomoléculas de la sonda en la región de los biochips experimentados que se muestran en la Figura 16;

35 La Figura 18 es un gráfico de barras que compara las eficiencias de unión representadas en la unidad de intensidad artificial de transporte mejorado electrocinéticamente y las eficiencias de unión representadas en la unidad de intensidad artificial de difusión pasiva; y

La Figura 19 es una representación esquemática que muestra varias dimensiones del biochip.

Descripción detallada de la realización preferida

40 Con referencia a las Figuras 1A y 1B de los dibujos, se muestra una realización preferida de un biochip **100** de acuerdo con la invención. Dos o más pocillos/cavidades **101** discretas se forman en una superficie **108A** de operación. Estos pocillos/cavidades están alineados para formar una pluralidad de filas de pocillos/cavidades **103**. Estas filas **103** corren paralelas entre sí y se extienden a través del biochip **100**. Cada fila **103** está separada por un hueco en forma de un surco **104** alargado. La forma de los pocillos/cavidades **103** puede ser de cualquier tamaño y forma.

El término cavidad puede utilizarse para describir cualquier indentación incluidos los pocillos **103** y surcos **104**.

50 Como se muestra en la Figura 1B, el biochip **100** es una laminación de o un conjunto de capas de material. Tiene un miembro base que puede incluir una capa **105** de óxido térmico depositada sobre una capa de sustrato **106** de silicio. Las bandas de material **107** conductor. Se colocan sobre la capa **105** de óxido térmico que forman los electrodos **107** del biochip **100** que corre debajo de cada fila **103**. Una capa de material **108** dieléctrico se deposita sobre los electrodos **107** para formar una superficie **108A** de operación del biochip. Los electrodos **107** están separados entre sí por el surco **104**. Los pocillos/cavidades **101** discretas y el surco **104** se forman en la superficie **108A** de operación en forma de una estructura cóncava y una ranura, respectivamente. En otras palabras, la

superficie de operación es una superficie **108A** de operación contorneada . Las entidades **109** de sonda están unidas a la superficie **108A** de operación de manera convencional.

El biochip **100** cuando está en uso está cubierto por una solución acuosa con entidades diana desembolsado su interior que forma el medio para la operación EK. Los conjuntos **107** de electrodos están incorporados debajo de capas aislantes tales como la capa de material **108** dieléctrico. Esta capa aislante evita que el electrodo entre en contacto directo con la solución del medio, lo que lleva a una reacción electroquímica, a saber, electrólisis. Al aplicar un campo eléctrico variable en el tiempo, el campo eléctrico puede penetrar en el medio de solución por encima de la superficie aislante. La existencia de intensidad de campo eléctrico en el medio puede inducir el flujo de fluido electrocinético y el movimiento de partículas. En la superficie de la capa **108** aislante, se proporcionan estructuras de pocillos/cavidades para regular específicamente los efectos de EK y concentrar las entidades objetivo en los sitios de reacción donde las entidades de sonda están inmovilizadas. Con el aumento de la concentración local, se mejora la oportunidad de colisión entre entidades objetivo con las entidades de sonda correspondientes. Este proceso se logra mediante las fuerzas DEP y el flujo de fluido ACEO/ACET en la superficie del chip, y es mucho más eficiente que la difusión pasiva en dispositivos de reacción convencionales. Un ejemplo se muestra en las Figuras 16 y 18 y se describirá más adelante.

El biochip **100** es capaz de manipular el flujo de fluido y ayuda en la eficiencia de enfoque de superficie. Las fuerzas electrocinéticas que actúan sobre las entidades objetivo, como EP y DEP, dependen en gran medida de la intensidad de campo y el gradiente del cuadrado de intensidad de campo, respectivamente. Sin embargo, la intensidad del campo eléctrico se atenúa exponencialmente en el medio, lo que limita el rango efectivo de la fuerza EK directa sobre partículas dentro de una distancia muy corta por encima de la superficie **107** del electrodo. En este caso, el conjunto **107** de electrodos es de manera plana, que está diseñada para inducir flujos de fluido de largo alcance por los efectos ACEO y/o ACET bajo el campo eléctrico de CA. Los flujos de fluido inducidos por ACEK se modelan de manera circulante, lo que puede refrescar continuamente las entidades objetivo en el fluido superficial con aquellas en el fluido en volumen.

Por último, mediante la aplicación de campo eléctrico de CA al biochip **100**, las entidades objetivo suspendidas en una solución acuosa son impulsadas a los sitios de reacción sobre la superficie del chip a través de los flujos de fluido inducido. Las estructuras superficiales regulan aún más el flujo y concentran las entidades objetivo en los sitios de reacción designados con la ayuda de las fuerzas DEP. La circulación del flujo de fluido, mientras tanto, actúa para reponer las entidades objetivo de la solución en volumen. Por lo tanto, con la combinación de efectos EK, se logran tanto la manipulación de largo alcance como la de corto alcance. La eficacia de reacción resultante se puede mejorar a partir del mecanismo basado en difusión.

En más detalle, como se muestra en la Figura 19, el ancho (**B**) del pozo/cavidad **101** discreto es de aproximadamente 10 nm a 1 mm y sería menor que el ancho (**F**) del electrodo **107** que es de aproximadamente 10 nm a 1 mm. La profundidad (**A**) de los pocillos/cavidades **101** es de aproximadamente 1 nm a 1 mm y es menor que el grosor (**G**) de la capa **108** dieléctrica, que es de aproximadamente 1 nm a 1 mm. El ancho (**D**) del surco **104** es mayor que el doble del espesor (**G**) de la capa **108** dieléctrica y menor o igual que el ancho (**F**) del electrodo **107**. La profundidad (**C**) del surco **104** es igual al espesor (**E**) del electrodo **107** que es de aproximadamente 1 nm a 1 mm. Los pocillos/cavidades **101** discretas tienen bordes superiores afilados con un radio de borde que es igual al exceso de longitud del grosor (**G**) de la capa **108** dieléctrica sobre la profundidad (**A**) del pozo/cavidad **101**. Los surcos **104** discretos también tienen bordes superiores afilados con un radio de borde que es igual al grosor (**G**) de la capa **108** dieléctrica. En resumen, cuanto menor es el radio del borde, mayor es el gradiente eléctrico establecido en el medio adyacente al reborde y al borde cuando el campo eléctrico es aplicado al electrodo.

Las técnicas y procesos de fabricación CMOS para la producción a nivel de oblea se utilizan para crear el biochip **100**. Hay cuatro capas cruciales. El sustrato del biochip es la oblea **106** de silicio. La oxidación térmica se realiza para crear una capa de base, una capa **105** de óxido térmico para la deposición de metal. El procedimiento de dispersión se usa para formar una capa **107** metálica y modelarla en conjuntos de microelectrodos por fotolitografía. Luego una capa **108** dieléctrica se deposita sobre la capa **107** metálica para proteger los electrodos **107** y el aislamiento. Los pocillos/cavidades **101** y los surcos **104** se forman por fotoenmascaramiento y grabado por fotolitografía. Los materiales de la capa dieléctrica se detallarán a continuación.

El sustrato **106** de silicio es preferiblemente un sustrato de materiales a base de silicio y materiales de polímeros sólidos. La capa de material **108** dieléctrico es preferiblemente una capa aislante hecha de óxido de silicio, nitruro de silicio, óxido de titanio u otros materiales dieléctricos.

Ahora se introduce el mecanismo y las condiciones que controlan la manipulación de EK en el biochip.

El conjunto de electrodos **107**, más preferiblemente de microelectrodos, están incorporados en el sustrato **106** de silicio preferentemente un chip de silicio para crear una distribución no uniforme de campo eléctrico en el medio de disolución. Múltiples efectos EK debido al campo eléctrico no uniforme son responsables de concentrar las entidades objetivo, induciendo el flujo de fluido/permitiendo la circulación por encima del biochip **100**. Entidades objetivo micro o submicroescaladas, como biomoléculas, por ejemplo, ácido nucleico, suspendidas en el medio de solución se transportan y circulan cerca de la superficie **108A** de operación desde el medio de solución debido al campo

eléctrico generado a partir del conjunto de electrodos **107**. Generalmente, el campo eléctrico no uniforme a gran escala se crea en el surco **104** entre cada electrodo que puede generar flujo de fluido EK de largo alcance y transportar entidades objetivo en volumen a la región cercana a la superficie del chip. La superficie **108A** de operación contorneada, particularmente con los pocillos/cavidades **101**, modifica la distribución local del campo eléctrico y mejora el rendimiento de la región corta EK.

Las principales actividades EK eficaces incluyen dielectroforesis (DEP), electroósmosis AC (ACEO), y electrotermosis AC (ACET). El fenómeno general es siempre una combinación de múltiples efectos. ACEO y ACET se clasifican como efectos electrohidrodinámicos, que inducen un flujo de fluido de largo alcance en el medio de solución. DEP es un movimiento de corto alcance sobre partículas. Como se ilustra en la Figura 4, ACEO y ACET son responsables de generar flujo de fluido para el transporte de largo alcance, y el DEP participa en confinamiento de corto alcance/transporte de fluido de corto alcance/regulación localizada. Con flujo de fluido de largo alcance inducido, las entidades como partículas que incluyen partículas cargadas o no cargadas, con un tamaño de micras a submicras pueden transportarse efectivamente cerca de la superficie **108A** de operación. Los pocillos/cavidades **101** modelados en la superficie **108A** de operación regulan aún más el campo eléctrico local y, por lo tanto, las partículas objetivo cercanas a la superficie **108A** de operación se concentran por las fuerzas DEP dentro de los pocillos/cavidades **101**.

En más detalle, el ACEO surge debido a la interacción entre la doble capa eléctrica (EDL) formado en la interfaz entre una solución y una superficie sólida cargada como la superficie **108A** de operación y un campo eléctrico en la dirección tangencial (es decir, E_t) para conducir los iones en la capa difusa de la EDL. Cuando un par de electrodos planos se carga con polaridad opuesta, el campo eléctrico es más fuerte en el espacio y más débil en el centro del electrodo, por lo tanto, el E_t . En ciertas circunstancias, existe otro efecto electrohidrodinámico, conocido como ACET, que se debe a la interacción entre el campo eléctrico y el gradiente de las propiedades del fluido. Dado que el campo eléctrico de CA puede inducir el calentamiento de Joule en el medio de solución y es más significativo en la región de alta intensidad de campo, el cambio de temperatura regional induce la variación de la densidad del fluido y, por lo tanto, la conductividad y la permitividad. Para un par de electrodos planos, ACET puede formar circulación desde el espacio del electrodo y agitar el fluido en volumen en un rango microescalado. En resumen, se pueden generar flujos de fluidos de largo alcance utilizando varios patrones de electrodos clásicos, como el paralelo, almenado, cuadrupolo, etc.

Para la manipulación de corto alcance, los efectos de DEP se vuelven más prometedor como la intensidad de campo, así como su gradiente son altos. La estructura que puede inducir un gradiente de campo agudo son los bordes de los pocillos/cavidades **101** que se modelan en la superficie **108A** de operación. Este campo de fuerza localizado permite patrones de conducción designados para la recolección de corto alcance de las entidades objetivo.

Además, es posible controlar los patrones de flujo de fluido y la recogida de partículas por el cambio de la tensión aplicada, la frecuencia y la formación del campo eléctrico de corriente alterna. El mecanismo puede usarse para mejorar la eficacia de la reacción bioquímica entre las moléculas objetivo suspendidas en el medio de solución y las moléculas equivalentes, por ejemplo, las entidades **109** de sonda inmovilizadas en la superficie **108A** de operación.

La superficie **108A** de operación contorneada por encima del conjunto **107** de electrodos genera gradientes de campo eléctrico y altera DEP, ACEO y ACET en específico. Dependiendo de la frecuencia del campo eléctrico y la conductividad del medio de solución, dirección del transporte de largo alcance, así como la del confinamiento de corto alcance/transporte de fluido de corto alcance/regulación localizada se puede manipular. El voltaje está más relacionado con la fuerza general de los efectos EK, es decir, la fuerza DEP es proporcional a $\nabla|E^2|$ en magnitud

Las Figuras 4A a 4D son una ilustración esquemática de la dirección del flujo EK de largo alcance y el flujo EK de corto alcance, de ahí la concentración de partículas dentro y fuera del pozo/cavidad **101** cuando diferentes tensiones, frecuencias y formaciones del campo eléctrico de CA se aplica al conjunto de electrodos **107**. El flujo EK de largo y corto alcance constituye directamente el transporte de largo alcance y el confinamiento de corto alcance/transporte de fluido de corto alcance/regulación localizada respectivamente para transportar las entidades objetivo en el medio de solución. En la Figura 4A, se muestra una vista en planta superior de los pocillos/cavidades **101** en la superficie **108A** de operación contorneada. La Figura 4B muestra la dirección del flujo EK cuando se aplica un campo eléctrico de baja frecuencia. La corriente principal del flujo EK apunta al centro del electrodo, y el gradiente localizado en el borde del pozo/cavidad **101** dirige las partículas hacia el centro del pozo/cavidad **101** y el electrodo **107**. La Figura 4C muestra la dirección del flujo EK cuando se aplica un campo eléctrico de frecuencia media. La corriente principal del flujo EK está apuntando al centro del electrodo **107**, y el gradiente localizado en el borde del pozo/cavidad **101** dirige las partículas lejos del centro del pozo/cavidad **101** y el electrodo **107**. La Figura 4D muestra la dirección del flujo EK cuando se aplica un campo eléctrico de alta frecuencia. La corriente principal del flujo EK y el gradiente localizado en el borde del pozo/cavidad **101** aleja las partículas del centro del pozo/cavidad **101** y el electrodo **107**. Como los pocillos/cavidades adyacentes **101** están separados por un surco **104**, cuando el flujo EK de corriente principal y el gradiente localizado se alejan del centro del pozo/cavidad **101**, se dirigen hacia el surco **104**. La situación en la Figura 4B es más óptima cuando las entidades **109** de sonda están unidas dentro de los pocillos/cavidades **101**.

La condición en las Figuras 4C y 4D es más óptima cuando las entidades **109** de sonda están unidas a la superficie **108A** de operación fuera de los pocillos/cavidades **101** o en el surco **104**.

5 Con la superficie **108A** de operación contorneada, somos capaces de manipular modelos de colección de entidades diana en la superficie **108A** de operación utilizando diferentes frecuencias, tensiones y formaciones del campo eléctrico de corriente alterna. Podemos modelar la superficie **108A** de operación en matriz o en cualquier disposición asimétrica en los electrodos **107**, dependiendo de las aplicaciones específicas.

10 Como se muestra en la Figura 9A se muestra un ejemplo de una superficie de operación con un conjunto de matriz de pozo/cavidad de N por N, donde N es un número impar. El biochip **100** se fabrica en obleas de 8" y se corta en cubos y se ensambla en PCB con circuitos y adaptador que se conectan a una fuente de alimentación externa. Todas las bandas **107** de electrodos impares están conectadas a la señal de CA, y el resto de las bandas de electrodos pares **107** están conectadas a tierra. El campo eléctrico de CA se suministra con un generador de funciones artificiales, Agilent 33250A. Las perlas de SiO₂ se usan en este ejemplo (Sigma S5631) para ilustrar el efecto de la frecuencia del campo eléctrico aplicado a la distribución activa de las entidades objetivo. Las perlas tienen un rango de 0,5 - 10 μm (80 % entre 1 - 5 μm), y se suspenden en DI H₂O con una conductividad de 5,5 μS/m.

15 Se dispensan 30 μl de la solución de perlas en la superficie **108A** de operación, cubriendo el conjunto de microelectrodos y el proceso de manipulación EK se registra a través del microscopio Nikon eclipse i50 bajo luz blanca.

20 Se recogieron las imágenes en la figura 9B para demostrar el efecto de transporte y enfoque de utilizar la superficie **108A** de operación de matriz de N por N modelada. La señal de CA aplicada es de una onda sinusoidal de pico a pico de 20V con una frecuencia que varía de 100 Hz a 1 MHz.

25 Cuando comenzó a 100 Hz, las perlas comenzaron a moverse lentamente. A medida que la frecuencia aumentó gradualmente a varios kHz, el movimiento se volvió más dramático, y el centro del pozo/cavidad **101** se concentró más con perlas. Se observó que, entre 100 Hz y 500 Hz, las perlas se atrajeron hacia el centro del electrodo y el pozo/cavidad **101** y permanecieron alrededor de la línea de simetría geométrica. También se observó que, a medida que la frecuencia aumentaba por encima de 500 Hz, las perlas recogidas en la línea central comenzaron a arrastrarse al pozo/cavidad **101** más cercano. En consecuencia, la "línea" se dividió en "puntos". Esto se debió al perfil descrito en la Figura 4B.

30 Se observa la forma redonda más discreta de grupos de perlas cuando la frecuencia del campo eléctrico es de 10 kHz. A medida que la frecuencia aumenta más allá de 10 kHz, el grupo de perlas comenzó a deformarse y se mueve fuera de los pocillos/cavidades **101** o el centro del electrodo **107** hacia los bordes del electrodo **107**. Luego se observó que las perlas circulaban desde el borde del electrodo **107** hacia el centro del electrodo, surgiendo y volviendo a la región del borde. El ancho de circulación se hizo más estrecho a medida que aumentaba la frecuencia. Este proceso de transición fue dramático alrededor de 10 kHz a 20 kHz, y a 40 kHz, la mayoría de las perlas se introdujeron en los surcos **104** y el espacio de los electrodos **107**, como se describe en la Figura 4D.

35 A partir de 40 kHz a 100 kHz, el ancho de circulación alcanza el mínimo y las perlas vibran en el borde del electrodo **107**, mientras que algunas perlas grandes de tamaño exhiben auto - rotación. Por encima de 100 kHz, las perlas formaron cadenas perpendiculares al electrodo entre los surcos **104**. Luego, las cadenas se rompieron a alrededor de 600 kHz, y las perlas se repelieron al centro de los electrodos **107** y surcos **104**. Este efecto se vuelve más significativo a 1 MHz. La razón por la cual las perlas formaron líneas distintas a los puntos discretos como en las frecuencias bajas fue porque los mecanismos dominantes del flujo de fluido eran diferentes. Más específicamente, a bajas frecuencias, las perlas experimentan un flujo de fluido inducido por ACEO, que es sensible a las estructuras superficiales. La estructura cóncava podría regular el flujo y atraer las perlas hacia adentro. Mientras que, a altas frecuencias, como en el nivel de MHz, ACEO ya no existía, ACET tomó el predominio, que hacía circular perlas desde el volumen, y era menos sensible a las estructuras superficiales.

45 En referencia a la Figura 10, se muestra el campo de fuerza DEP simulado (flecha roja) en un medio de solución de alta conductividad con campo eléctrico de alta frecuencia. Todas las flechas se alejan de los electrodos **107** y las cavidades **101**.

50 Volviendo a las figuras 11A y 11B, en un medio de baja conductividad y con campo eléctrico de baja frecuencia, la fuerza DEP, que se muestra por las flechas, se dirige hacia los pocillos/cavidades **101** y el surco **104** y lejos de la superficie **108A** de operación adyacente al pozo/cavidad **101**. Lo mismo se aplica cuando el medio de solución es de baja conductividad y se aplica un campo eléctrico de frecuencia media (ver Figura 12A y 12B), excepto que el campo local está más concentrado hacia el pozo/cavidad **101**. En un nivel bajo campo eléctrico de media y alta frecuencia de conductividad como se muestra en las Figuras 13A y 13B, la fuerza DEP se dirige lejos del pozo/cavidad **101** y el surco **104** pero hacia la superficie **108A** de operación adyacente al pozo/cavidad **101**. En las Figuras 14A y 14B, cuando la conductividad del medio es alta y la frecuencia del campo eléctrico es baja, la fuerza DEP se dirige lejos del pozo/cavidad **101** y el surco **104** pero hacia la superficie **108A** de operación adyacente al pozo/cavidad **101**. En las Figuras 15A y 15B, cuando el medio de solución es de alta conductividad y el campo eléctrico está en alta frecuencia, la fuerza DEP se dirige lejos del pozo/cavidad **101** y el surco **104** pero hacia la superficie **108A** de operación adyacente al pozo/cavidad **101**.

- En resumen, de un diseño específico biochip descrito anteriormente, en un medio de alta conductividad, incluso si el campo eléctrico aplicado tiene una frecuencia baja, la fuerza DEP se dirige lejos de los pocillos/cavidades **101**. Para dirigir la fuerza DEP hacia el pozo/cavidad **101**, casi siempre se debe usar medio de baja conductividad. Al dirigir la fuerza DEP lejos del pozo/cavidad **101**, se debe usar una alta frecuencia y la conductividad del medio no es una preocupación importante. Puede que esta no sea una solución universal, ya que solo las frecuencias bajas a medias y el medio conductivo bajo pueden dirigir entidades a la matriz del pozo/cavidad **103**. El diseño del electrodo **107** y el pozo/cavidad **103** patrón son más cruciales para modular las combinaciones de fuerzas EK y, por lo tanto, las entidades objetivo dentro o fuera del pozo/cavidad **103**. El diseño del electrodo **107** y las estructuras del pozo/cavidad **103** pueden incluir el material, escalas o formas del mismo.
- El biochip **100** produce incluso mejores resultados mediante la mejora de la hibridación Asistida por EK. Como se muestra en la Figura 2, las entidades de sonda se unen mediante ingeniería de superficie a la superficie **108A** de operación mediante enlaces covalentes a una matriz química de una manera convencional. El objetivo del biochip **100** de acuerdo con la invención es mejorar la interacción entre las entidades objetivo en el medio de solución y las entidades **109** de sonda en la superficie **108A** de operación usando efectos electrocinéticos (EK). En la Figura 5 se muestra una comparación simulada entre la hibridación pasiva y la hibridación asistida por EK. La Figura 16 es una comparación fotográfica entre dos biochips, la izquierda muestra el resultado de la hibridación asistida por EK y la derecha muestra los resultados de la hibridación pasiva. Claramente, la hibridación asistida por EK produce mejores resultados. La figura 18 es la representación de la intensidad de la unidad artificial del resultado de hibridación en los dos biochips de la figura 16.
- Pasamos ahora al procedimiento de fabricación del biochip **100**. Se muestra el procedimiento preferido en la Figura 6.
- El proceso se basa en una fabricación microelectrónica compatible CMOS. En un sustrato **106** de silicio, un espesor de la capa **105** de óxido se produce por oxidación térmica, y una capa **107** de metal se construye mediante pulverización catódica de aluminio. Los conjuntos de electrodos se forman mediante grabado en seco de la capa **107** metálica. Después del proceso de metalización, la capa **108** dieléctrica de óxido de silicio (SiO_2) se deposita a través de PECVD sobre la superficie superior definida por la capa **107** metálica. El conjunto de pocillos/cavidades **101** así como las micro - indentaciones de la almohadilla de unión de cable se modelan y abren mediante grabado en seco. Luego, una segunda capa **108** de SiO_2 se deposita con espesor sobre la primera capa de SiO_2 usando PECVD. La fabricación del chip se completa con un proceso final de grabado en seco para la apertura completa de las almohadillas de unión de cables. Un proceso adicional implica el tratamiento superficial del biochip **100** para la inmovilización de las entidades **109** de sonda en cada pozo/cavidad **101**. El biochip **100** ahora está listo para su uso.
- Haciendo referencia a la Figura 7 que muestra un proceso basado en una fabricación microelectrónica compatible CMOS. En un sustrato **106** de silicio, un espesor de la capa **105** de óxido se produce por oxidación térmica, y una capa **107** de metal se construye mediante pulverización catódica de aluminio. Los conjuntos **107** de electrodos se forman mediante grabado en seco de esta capa **107** de metal. Se aplica otra máscara para el patrón del pozo/cavidad **101**, y sigue el grabado para crear el pozo/cavidad **101** en los electrodos de metal **107**. Después de eso, se deposita la capa dieléctrica de un óxido de silicio (SiO_2) a través de PECVD sobre la superficie superior de la capa **107** metálica. Las micro - indentaciones de la almohadilla de unión de cable se modelan y se abren mediante grabado en seco.
- Con referencia a la Figura 8, que nuevamente se basa en una fabricación microelectrónica compatible con CMOS. En un sustrato **106** de silicio, un espesor de la capa **105** de óxido se produce por oxidación térmica. Aplicamos una máscara fotográfica para modelar pocillos/cavidades **101**, y realizamos un grabado en seco en la capa **105** de óxido térmico. Después de eso, los pocillos/cavidades **101** se forman en la capa **105** de óxido. Se deposita una capa de metal en la superficie superior de la capa **105** de óxido y construida mediante pulverización catódica de aluminio. Los conjuntos de electrodos se forman mediante grabado en seco de esta capa **107** metálica. Después de eso, se deposita una capa dieléctrica de óxido de silicio (SiO_2) a través de PECVD sobre la superficie superior definida en la capa **107** metálica. Las micro - indentaciones de la almohadilla de unión de cable son modelado y abierto por grabado en seco.
- La invención ha sido dada a modo de ejemplo solamente, y otras diversas modificaciones y/o alteraciones a la realización descrita pueden hacerse por los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas .

REIVINDICACIONES

1. Un biochip (100) para detectar o secuenciar biomoléculas que comprende:
 - un miembro base;
 - una capa (108) dieléctrica depositada sobre el miembro base y que tiene cavidades (101, 104) discretas formadas sobre ella; y
 - dos o más electrodos (107) intercalados entre el miembro base y la capa (108) dieléctrica y que funcionan bajo las filas respectivas de cavidades (101) discretas, estando los dos o más electrodos (107) separados entre sí a lo largo de su longitud por una porción de la capa (108) dieléctrica;
 - en el que la capa (108) dieléctrica define una superficie de operación continua por encima de los electrodos (107) y en la cual están formadas las cavidades discretas (101, 104) para detectar o secuenciar biomoléculas, de modo que la aplicación de un campo eléctrico a dichos electrodos (107) provoca que se cree un gradiente de campo para atraer biomoléculas hacia una parte preferida de la superficie de operación;
 - en el que las cavidades (101, 104) comprenden dos o más filas de pocillos (101) y uno o más surcos (104), en el que los uno o más surcos (104) están formados entre dos filas de pocillos (103); y
 - en el que cada electrodo (107) se extiende a través del miembro base y es común a los pocillos (101) en una misma fila (103).
2. El biochip según la reivindicación 1, en el que el uno o más surcos (104) separan los dos o más electrodos (107).
3. El biochip según la reivindicación 1 o 2, en el que cada uno de los dos o más electrodos (107) comprende una banda alargada de material conductor eléctrico.
4. El biochip (100) según la reivindicación 3, en el que los dos o más electrodos (107) están depositados directamente debajo de la capa (108) dieléctrica.
5. El biochip (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cada uno de los dos o más electrodos (107) tiene un ancho predeterminado de 10 nm a 1 mm y/o en el que cada uno de los electrodos (107) tiene un espesor predeterminado de 1 nm a 1 mm y opcionalmente en el que cada pocillo (101) tiene un ancho predeterminado de 10 nm a 1 mm que es más pequeño que el ancho predeterminado de cada uno de los electrodos (107).
6. El biochip (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la capa (108) dieléctrica tiene un espesor de 1 nm a 1 mm y opcionalmente en el que cada pocillo (101) tiene una profundidad predeterminada de 1 nm a 1 mm que es menor que el espesor de la capa (108) dieléctrica.
7. El biochip (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la capa (108) dieléctrica tiene un espesor de 1 nm a 1 mm y cada uno de los dos o más electrodos (107) tiene un ancho de 10 nm a 1 mm y en el que el surco (104) tiene un ancho predeterminado mayor que el doble del espesor de la capa (108) dieléctrica y no mayor que el ancho de cada uno de los dos o más electrodos (107).
8. El biochip (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la capa (108) dieléctrica comprende un material dieléctrico seleccionado de un grupo que consiste en óxido de silicio, nitruro de silicio, óxido de aluminio y óxido de titanio.
9. El biochip (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el miembro base comprende una capa de óxido térmico (105) depositado sobre una capa de sustrato de silicio (106).
10. El biochip (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que una o más entidades de sonda están unidas a la superficie de operación en las cavidades (101, 104) para abastecer el uso de un campo eléctrico de baja frecuencia para crear un gradiente de campo que atrae las biomoléculas hacia la cavidad (101, 104) o en el que una o más entidades de sonda están unidas a la superficie de operación y fuera de las cavidades (101, 104) para abastecer el uso de un campo eléctrico de alta frecuencia para crear un gradiente de campo que obliga a las biomoléculas a ir hacia la superficie de operación fuera de la cavidad (101, 104).
11. Un procedimiento de fabricación del biochip (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar un miembro base, en el que el miembro base comprende una capa metálica depositada sobre una capa de óxido térmico, definiendo la capa metálica una superficie superior;
 - b) foto enmascarar la superficie superior del miembro base;
 - c) grabar dos o más cavidades (101, 104) en la superficie superior;

d) realizar una segunda ronda de etapas b) y c) en la superficie superior y entre las dos o más cavidades para crear otra cavidad entre ellas, definiendo así una capa superior;

e) depositar un material dieléctrico en la capa superior sobre las cavidades (101, 104);

5 en el que las cavidades (101, 104) definen un contorno en la superficie superior, el material dieléctrico adopta al menos parte del contorno y se endurece para formar una superficie de operación contorneada.

12. Un procedimiento de fabricación del biochip (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende las etapas de:

a) proporcionar un miembro base, en el que el miembro base comprende una capa metálica depositada sobre una capa de óxido térmico, definiendo la capa de metal una superficie superior;

10 b) foto enmascarar la superficie superior del miembro base;

c) grabar dos o más cavidades (101, 104) en la superficie superior;

15 d) depositar un material dieléctrico en la superficie superior sobre las dos o más cavidades (101, 104) para formar una superficie superior adicional, en el que las dos o más cavidades (101, 104) definen un contorno en la superficie superior, el material dieléctrico adopta al menos parte del contorno y se endurece para formar una superficie de operación contorneada;

e) realizar una segunda ronda de etapas b) y c) en la superficie superior adicional para crear una cavidad adicional entre las dos o más cavidades, definiendo así una capa superior que tiene otro contorno;

f) repetir la etapa d) en la capa superior de modo que el material dieléctrico adopte el otro contorno y se endurezca para formar una superficie de operación contorneada.

20 13. Un procedimiento de fabricación del biochip (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un miembro base, en el que el miembro base incluye al menos una capa de óxido térmico que define una superficie superior;

b) foto enmascarar la superficie superior del miembro base;

25 c) grabar dos o más cavidades (101, 104) en la superficie superior para definir un contorno;

d) depositar una capa de metal sobre la superficie superior para formar otra superficie superior que adopta el contorno;

e) realizar una segunda ronda de etapas b) y c) en la superficie superior adicional para crear una cavidad adicional entre las dos cavidades para definir aún más el contorno y formar una capa superior;

30 f) depositar un material dieléctrico en la capa superior sobre las dos o más cavidades (101, 104);

en el que la una o más cavidades (101, 104) definen un contorno en la superficie superior, el material dieléctrico adopta al menos parte del contorno y se endurece para formar una superficie de operación contorneada.

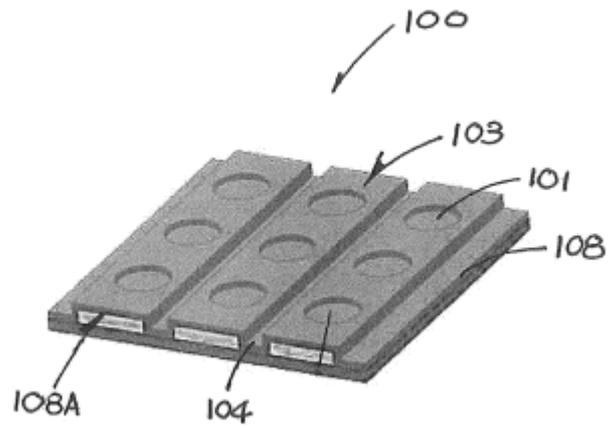


Figura 1A

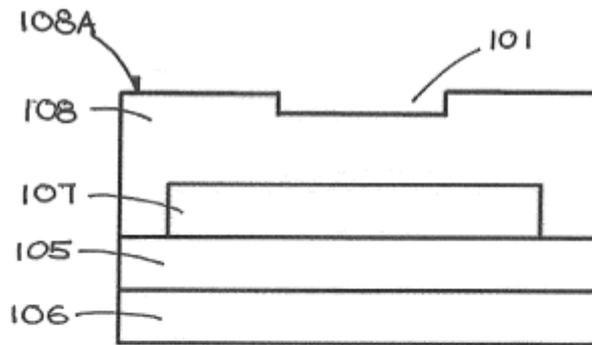


Figura 1B

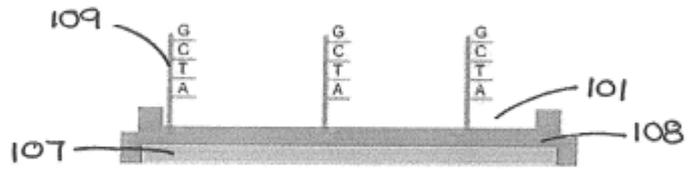


Figura 2

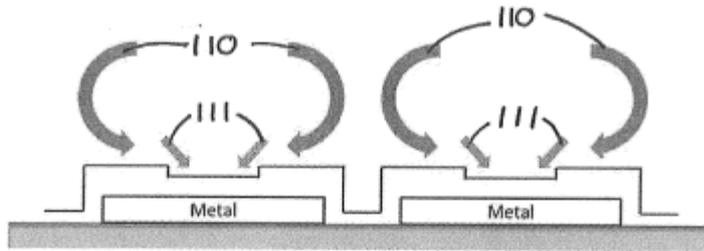


Figura 3

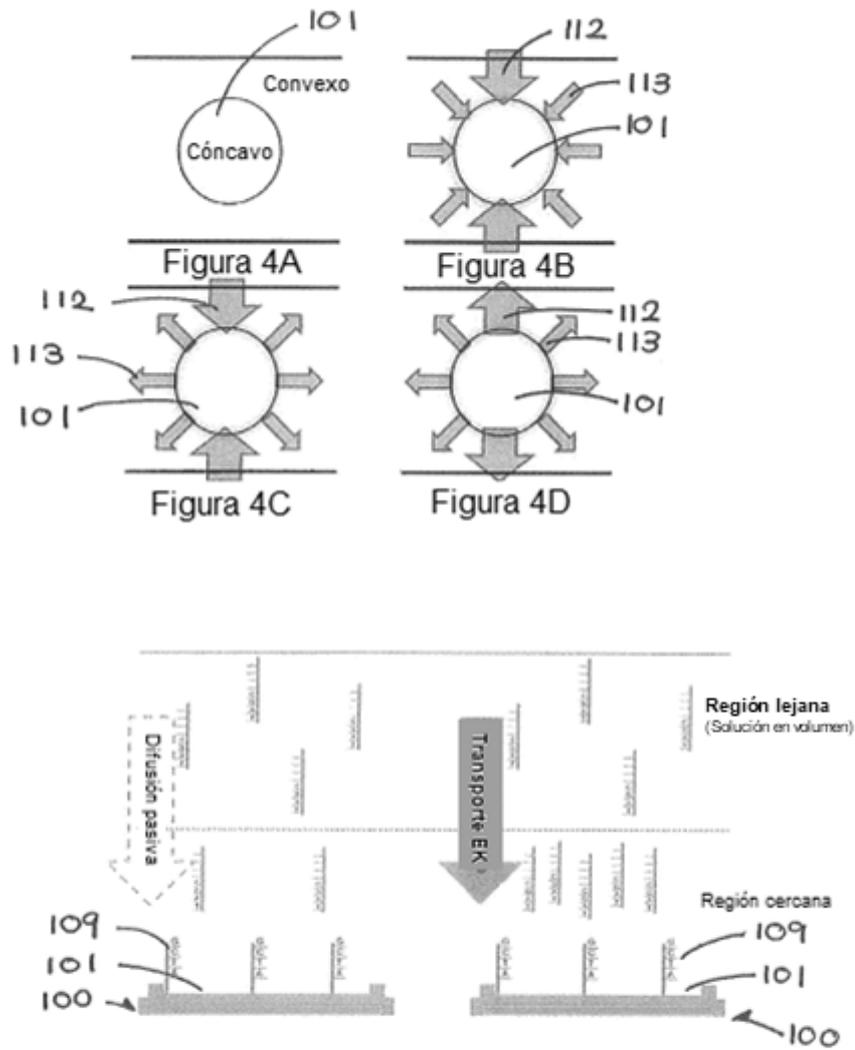


Figura 5

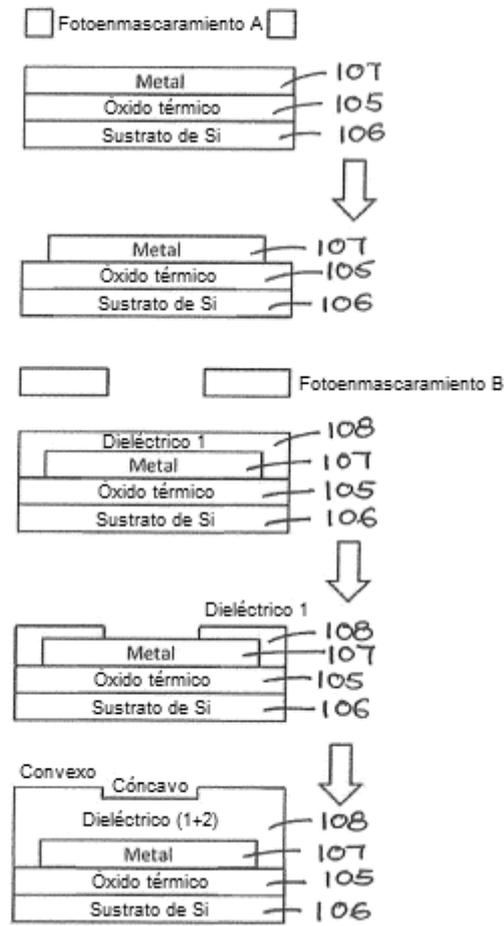


Figura 6

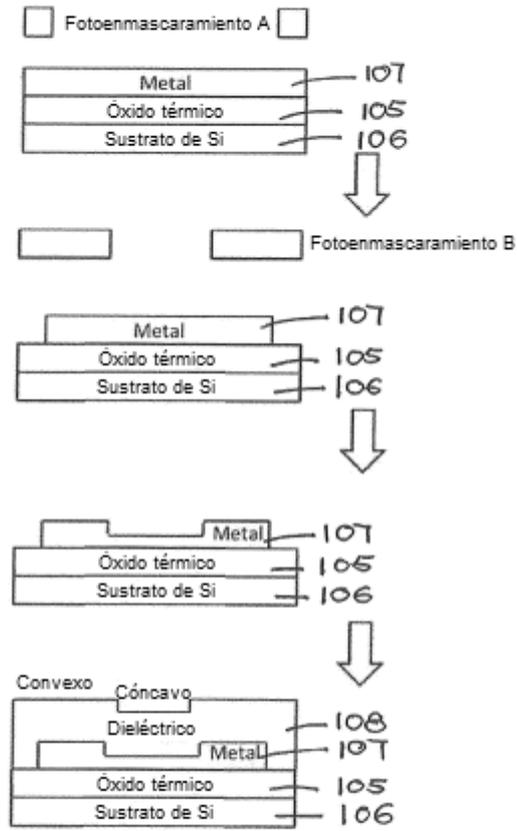


Figura 7

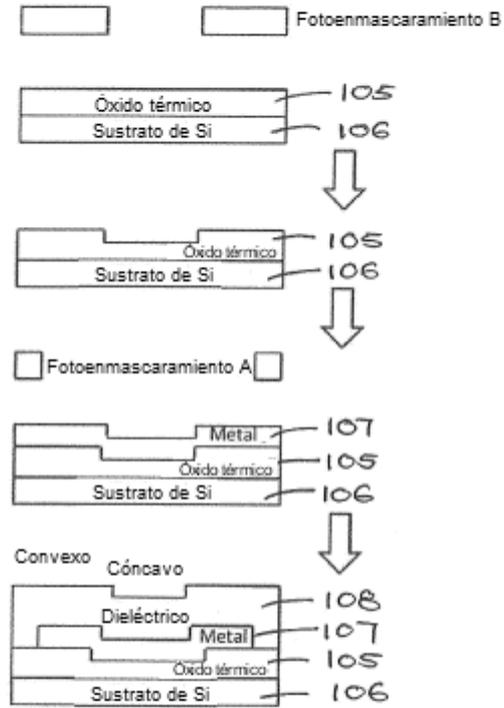


Figura 8

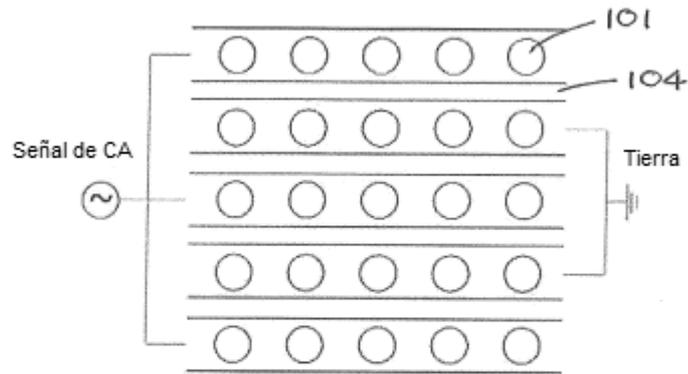


Figura 9A

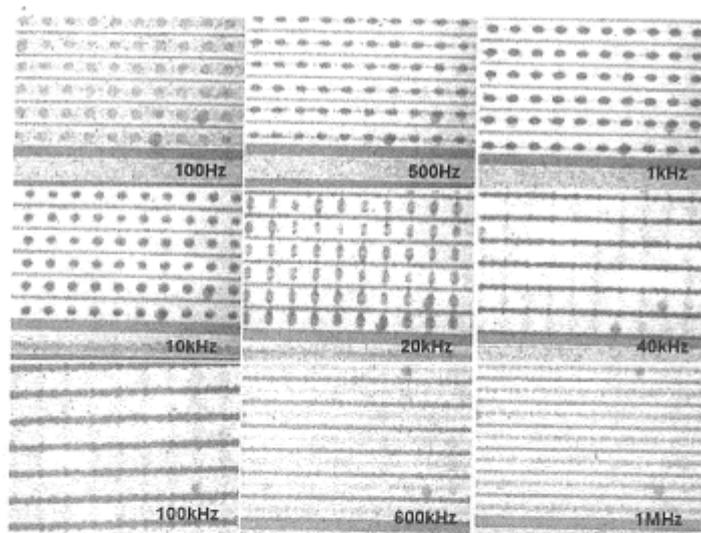


Figura 9B

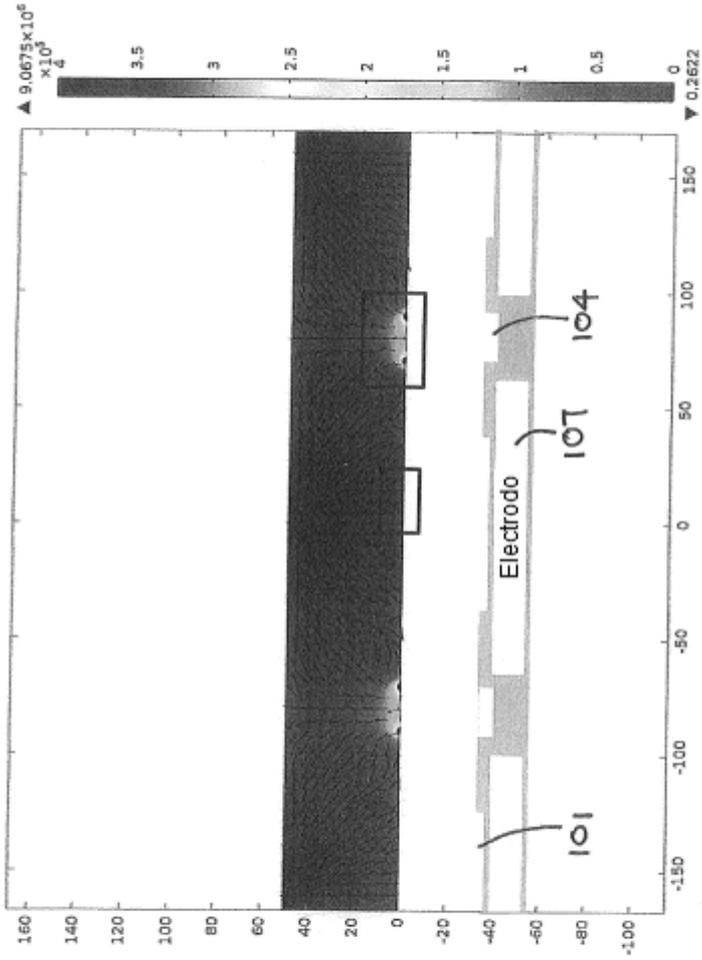


Figura 10

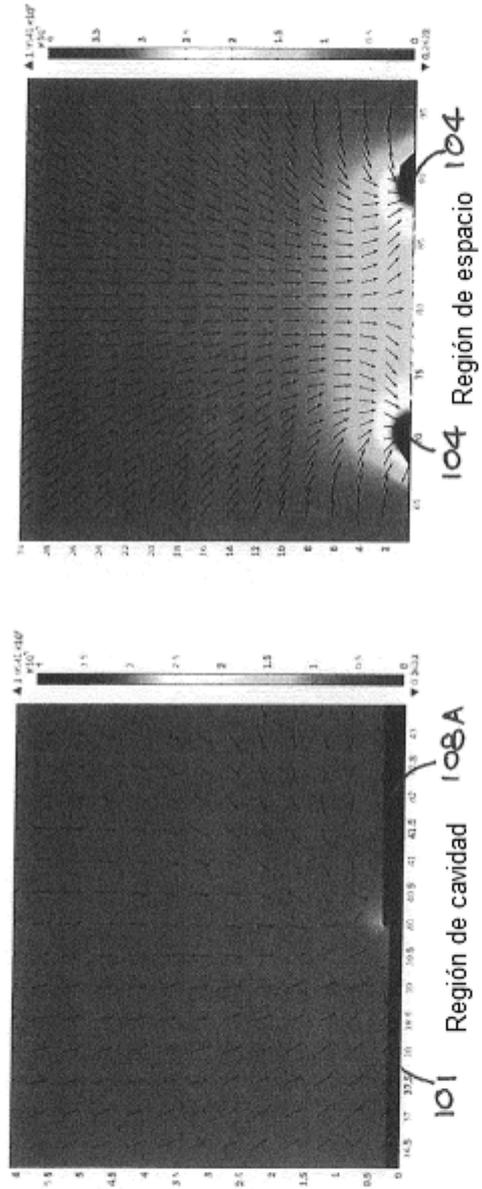


Figura 11A

Figura 11B

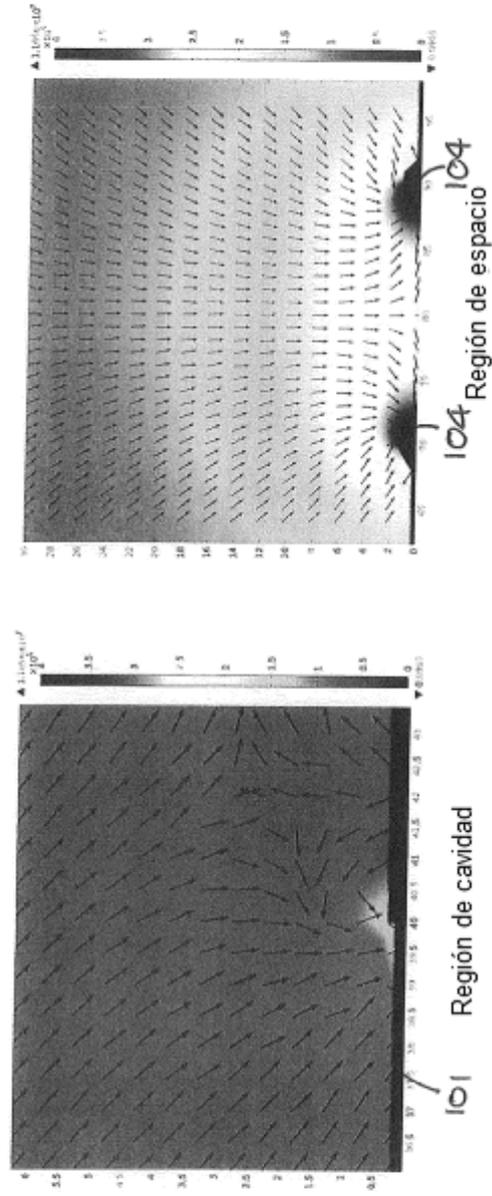


Figura 12A

Figura 12B

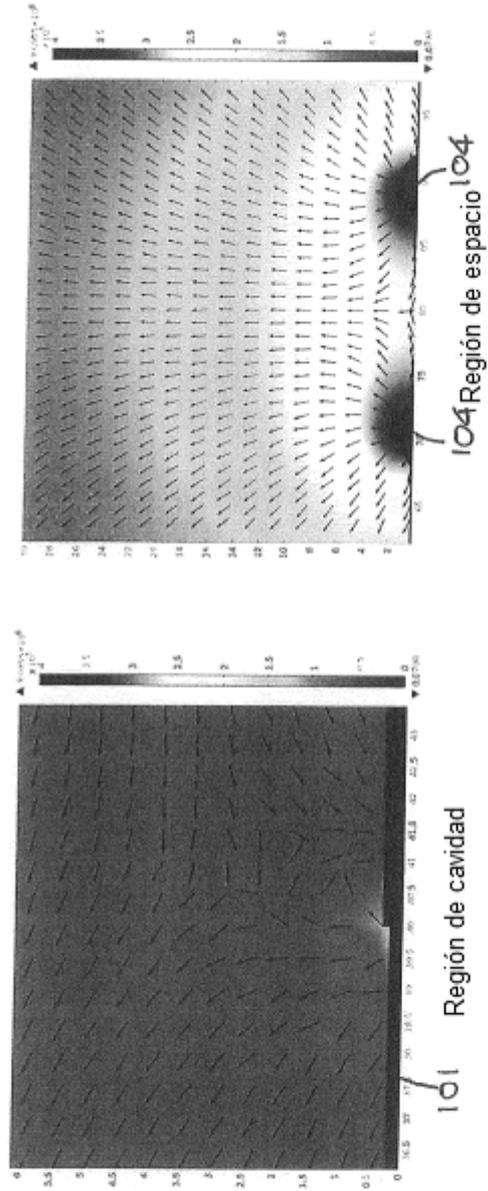


Figura 13A

Figura 13B

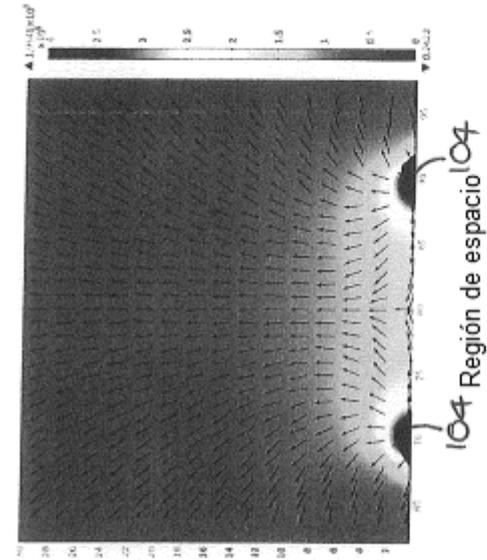


Figura 14A

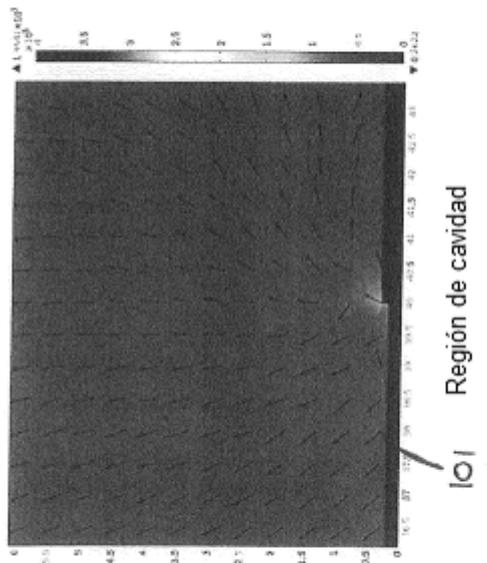


Figura 14B

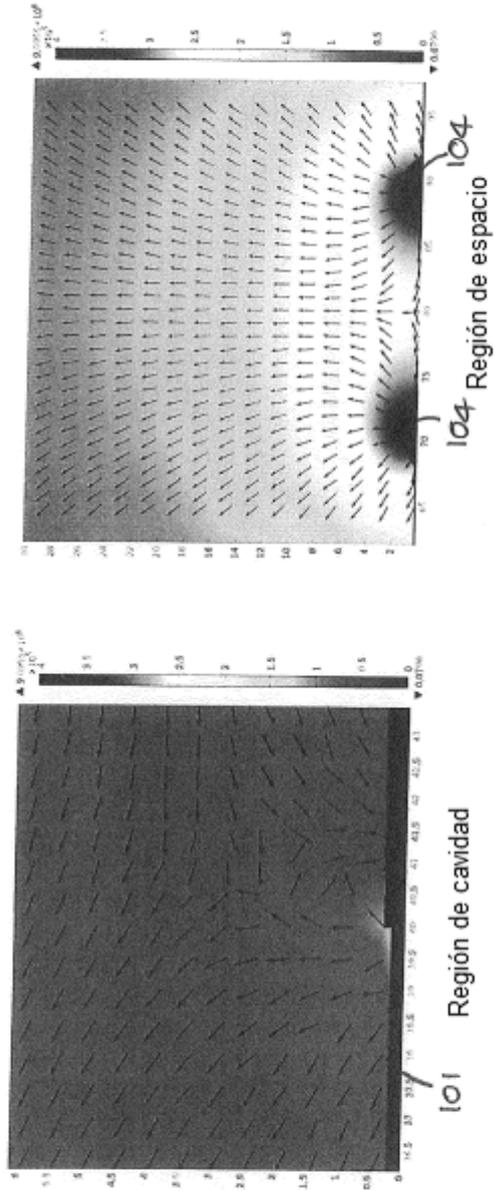


Figura 15A

Figura 15B

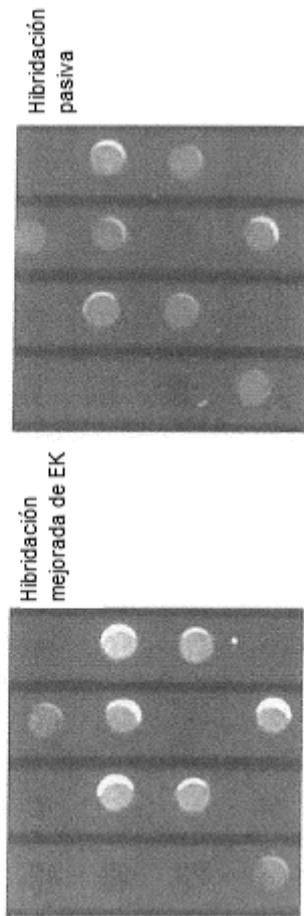


Figura 16

0	2	1	0
2	3	4	5
0	6		6
1			7

Patrón de sondas

	-ve ctrl	+ve ctrl	
	Objetivo 1	Objetivo 2	Objetivo 3
			Objetivo 4
			Objetivo 5
	+ve ctrl		

Significado de sondas

Figura 17

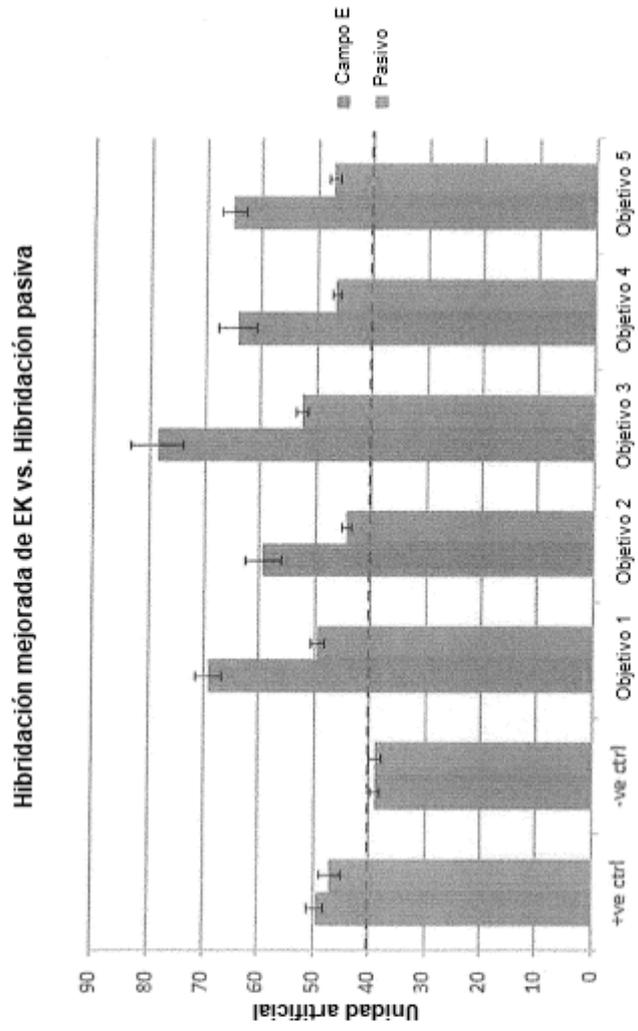


Figura 18

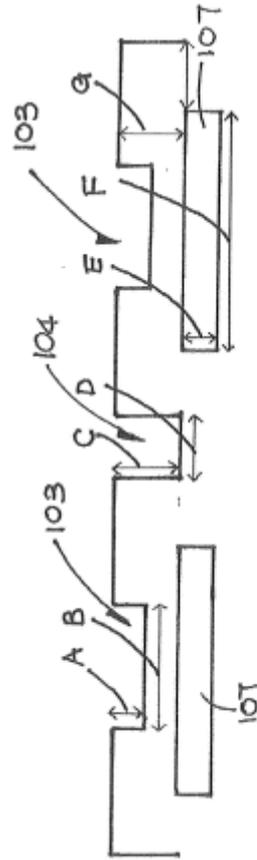


Figura 19