

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102008901691466A1

Publication Date

20100630

Applicant

STMICROELECTRONICS (ROUSSET) SAS

Title

DISPOSITIVO DI RILEVAMENTO ELETTRONICO DI MATERIALI BIOLOGICI E
RELATIVO PROCESSO DI FABBRICAZIONE

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:
"DISPOSITIVO DI RILEVAMENTO ELETTRONICO DI MATERIALI
BIOLOGICI E RELATIVO PROCESSO DI FABBRICAZIONE"
di STMICROELECTRONICS S.R.L.
di nazionalità italiana
con sede: VIA C. OLIVETTI, 2
AGRATE BRIANZA (MI)
Inventori: VILLA Flavio Francesco, MASTROMATTEO Ubaldo,
BARLOCCHI Gabriele

* * *

La presente invenzione riguarda un dispositivo di rilevamento elettronico di materiali biologici, quali acidi nucleici, proteine, lipidi, carboidrati e simili.

Come è noto, l'identificazione di sequenze di specifici materiali biologici è importante in molte aree includenti la diagnosi clinica, ambientale e del cibo microbiologico. In particolare, l'analisi di sequenze di geni gioca un ruolo fondamentale nel rilevamento rapido di mutazioni genetiche e organismi infetti. Ciò significa che è possibile effettuare diagnosi affidabili di malattie persino prima che appaiano sintomi.

Procedure tipiche per l'analisi di materiali biologici, quali acidi nucleici, proteine, lipidi,

Elena CERBARO
(Iscrizione Albo nr. 426/BM)

carboidrati, e altre molecole biologiche, richiedono diverse operazioni a partire dal materiale grezzo. Queste operazioni possono includere vari gradi di separazione o purificazione di cellule, lisi, amplificazione o purificazione e analisi dei prodotti dell'amplificazione o della purificazione.

Ad esempio, nelle analisi del sangue basate sul DNA, i campioni ("probes") vengono spesso purificati per filtrazione, centrifugazione o per elettroforesi in modo da eliminare tutte le cellule non nucleate, che generalmente non sono utili per l'analisi del DNA. Quindi, i globuli bianchi rimanenti sono rotti o sottoposti a lisi utilizzando mezzi chimici, termici o biochimici allo scopo di liberare il DNA da analizzare. In seguito, il DNA viene denaturato mediante processi termici, biochimici o chimici e amplificato mediante una reazione di amplificazione, quale la PCR (reazione a catena della polimerasi), LCR (reazione a catena della ligasi), SDA (amplificazione a spostamento di filamento), TMA (amplificazione mediata da trascrizione), RCA (amplificazione a circolo ruotante), e simili. La fase di amplificazione consente all'operatore di evitare lo studio della purificazione del DNA dato che il prodotto amplificato supera di tanto il DNA di partenza nel campione.

Se deve essere analizzato l'RNA, le procedure sono simili, ma l'enfasi è puntata sulla purificazione o altri mezzi per proteggere le labili molecole di RNA. L'RNA viene solitamente copiato in DNA (cDNA) e quindi l'analisi procede come descritto per il DNA.

Infine, il prodotto dell'amplificazione è sottoposto ad analisi, usualmente basata sulla sequenza o dimensione o una loro combinazione. Una tecnica di analisi comune è l'analisi per ibridizzazione, in cui il DNA amplificato viene fatto passare su una pluralità di rilevatori fatti di frammenti rilevatori di oligonucleotidi individuali che sono ancorati su substrati adatti. I frammenti rilevatori di oligonucleotidi individuali o "sonde" possono essere complementari ai filamenti di DNA amplificati bersaglio. Se i filamenti di DNA amplificati sono complementari alle sonde, si formano legami stabili fra loro (ibridizzazione). La presenza di DNA a doppia elica nella miscela è perciò indicativa di una corrispondenza ("matching") e l'ibridizzazione serve come meccanismo di rilevamento di sequenza.

In microschiere standard, le sonde sono attaccate ad una superficie solida (vetro o silicio) utilizzando una molecola di legame. L'ibridizzazione sonda-bersaglio viene usualmente rilevata e quantificata

mediante rilevamento basato su fluorescenza. I rilevatori ibridizzati possono essere letti usando molti mezzi, includenti mezzi ottici, elettromagnetici, elettromeccanici o termici.

Il rilevamento basato su fluorescenza, tuttavia, ha diversi svantaggi importanti, dato che

- 1) richiede la manipolazione preventiva dell'analita per introdurre i marker ottici;

- 2) richiede strumentazione costosa per la lettura ottica. Apparecchiature commerciali tipiche sono sistemi con tubi fotomoltiplicatori (PMT) o dispositivi ad accoppiamento di carica (CCD). Questi rilevatori consumano elevata potenza e non possono essere integrati facilmente in modo economico in circuiti elettronici;

- 3) la sua sensibilità può essere limitata da eventuali disomogeneità nella distribuzione dei marker.

Recentemente, è stato proposto l'uso di microbilance di cristallo di quarzo (QCM) per il rilevamento dell'ibridizzazione, che evita la necessità di radioisotopi o fluorofori. Il quarzo è membro di una famiglia di cristalli che sono soggetti all'effetto piezoelettrico (generano un potenziale elettrico in risposta a stress meccanici applicati), e la relazione fra tensione applicata e deformazione meccanica è ben

conosciuta. Una microbilancia QCM misura una massa per unità di area misurando il cambiamento di frequenza di un risonatore al cristallo di quarzo, in cui la risonanza è alterata dall'aggiunta o dalla rimozione di una piccola massa. La microbilancia QCM può essere utilizzata sotto vuoto, in fase gassosa, e più recentemente in ambienti liquidi. Nei liquidi, essa è molto efficiente nel determinare l'affinità di molecole con superfici funzionalizzate dotate di siti di riconoscimento, e può essere usata per rilevare l'ibridizzazione di acidi nucleici, leganti di peptidi, e così via. E' possibile eseguire misure di frequenza con elevata precisione, quindi è facile misurare densità di massa inferiori a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Le figure 1a e 1b mostrano una microbilancia di cristallo di quarzo 1 comprendente un disco di quarzo 2 avente elettrodi d'oro 3a, 3b sagomati su lati opposti del disco di quarzo 2. Un elettrodo 3a è coperto da uno strato di rilevamento 4 capace di legarsi con un analita di interesse (rappresentato dai puntini 5 in figura 1b). L'applicazione di un campo elettrico oscillante tra gli elettrodi 3a, 3b mediante un oscillatore 6 causa vibrazioni meccaniche, la cui frequenza è correlata al carico acustico della microbilancia 1.

Per effetto dell'ibridizzazione, la massa del disco di quarzo 2 aumenta e causa una variazione della frequenza di oscillazione del disco di quarzo 2. Dato che il disco di quarzo 2 è piezoelettrico, la variazione della frequenza oscillazione meccanica viene convertita in una variazione della frequenza di risonanza, misurabile facilmente.

La figura 2 mostra un disco di quarzo 2, funzionalizzato con uno strato sonda di DNA biotinilato avente un'elevata affinità con uno strato di streptavidina depositato precedentemente. In particolare, la figura 2 mostra una microbilancia 1 in cui lo strato di rilevamento 4 comprende una pluralità di segmenti di DNA a singolo filamento 7 funzionalizzati da biotina 8; la biotina 8 è legata ad uno strato di streptavidina 9 depositato sul disco di quarzo 2. Nel disegno, il segmento di DNA a singolo filamento 7 è legato ad un filamento bersaglio 13, formando un filamento a doppia elica 14.

L'equazione di base descrivente la relazione fra il cambio di frequenza di risonanza di un cristallo piezoelettrico oscillante e la massa depositata sulla superficie del cristallo è stata ricavata da Sauerbrey nel 1959. Sia A l'area del cristallo di quarzo in cm^2 , ΔM la differenza di massa dovuta all'ibridizzazione in

g, f_0 la frequenza di risonanza di riposo di un cristallo di quarzo piezoelettrico in MHz prima dell'ibridizzazione, si può ottenere:

$$\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} \frac{f_o^2}{A} \Delta m \quad (1)$$

La sensibilità S di un sensore a cristallo è data da:

$$S = \frac{\Delta f}{\Delta m} = -2.26 \times 10^{-6} \frac{f_o^2}{A} \quad (2)$$

Quindi, per un dato cristallo piezoelettrico, la sensibilità di una microbilancia può essere aumentata diminuendo l'area A della superficie dell'elettrodo. Perciò, la miniaturizzazione (ad es., l'integrazione nel silicio) consente alla microbilancia QCM di raggiungere una sensibilità molto alta, tale da essere in grado di rilevare variazioni di massa anche molto piccole.

Sono stati descritti sensori piezoelettrici a semiconduttore per molte applicazioni. In particolare, sono noti sensori integrati nel bulk, a onda acustica, utilizzando strati piezoelettrici, in cui uno strato piezoelettrico, interposto fra due strati di elettrodo, sovrasta una cavità e forma un risonatore acustico (si veda, ad es., "Bulk Acoustic Wave Theory e Devices" Joel F. Rosenbaum Artech House Inc, 1988).

Questi risonatori elettro-acustici sono stati proposti per formare sensori di differenti tipi, quali

Elena CERBARO
(Iscrizione Albo nr. 426/BM)

sensori di forza, pressione, accelerazione, peso e chimici, che sfruttano la variazione della frequenza di oscillazione del risonatore acustico per effetto di una variazione di massa e/o della sua configurazione geometrica.

I sensori noti hanno cavità formate mediante microlavorazione del bulk per attacco di un substrato di silicio dal retro usando tetrametilammonioidrossido (TMAH, si veda, ad es. "Sensors e Microsystems: Proceedings of the 10th Italian Conference" A. G. Mignani, R. Falciai, C. Di Natale, A. D'Amico, World Scientific Publishing Company, July 2008 - pagg. 326-331). In particolare, secondo questa tecnica nota, uno strato di nitruro di silicio, agente come etch stop, è depositato su una superficie di un substrato di silicio. Quindi viene depositata una pila formata da un primo strato di alluminio (elettrodo inferiore), uno strato di nitruro di silicio (materiale piezoelettrico) ed un secondo strato di alluminio (secondo elettrodo). Il substrato viene attaccato anisotropicamente dal retro e l'attacco si arresta sullo strato di nitruro di silicio. La fetta viene quindi tagliata. In ciascun "die" così ottenuto, la pila definisce una membrana sulla quale può essere depositato un sottile strato di un materiale sonda sensibile, quale porfirina.

Questo processo è costoso e richiede un processo di allineamento fronte-retro complesso. Inoltre, tale struttura presenta elevata frequenza di oscillazione (dell'ordine dei GHz), che richiederebbe l'uso di circuiti complessi per il pilotaggio e l'elaborazione dei segnali. Le alte frequenze sono legate allo spessore ridotto della struttura oscillante, quindi, per ridurre la frequenza di lavoro, è possibile aumentare lo spessore della membrana. Per esempio, usando il processo di microlavorazione del bulk sopra descritto, è possibile interrompere l'attacco del bulk etch prima di raggiungere lo strato di etch stop così da formare una membrana di silicio avente effetto smorzante sull'oscillazione. A tale scopo, è possibile usare un attacco a tempo. Tuttavia questa soluzione non consente di controllare in modo preciso lo spessore della membrana e quindi della frequenza di oscillazione propria del risonatore. In altre parole, la tecnica di lavorazione indicata, pur consentendo di realizzare una membrana più spessa, non è ottimale, in quanto comporta un'elevata variabilità dei parametri elettrici della bilancia, con necessità di calibrazioni successive, e calibrazioni post-lavorazione, ed ulteriore aumento dei costi di fabbricazione.

Inoltre, questa procedura di attacco comporta la

formazione di una cavità di sezione trapezoidale avente base minore formata dalla membrana e lati inclinati di 40° - 60° . Dato che lo spessore del substrato è generalmente di circa 675-700 μm , la base maggiore della cavità è più lunga di circa 1,2-1,4 mm rispetto alla membrana. L'area totale richiesta da ciascuna microbilancia è quindi molto maggiore rispetto a quella dovuta alla sola regione oscillante. La microbilancia presenta quindi complessivamente ingombro elevato.

Di conseguenza, in generale, i sensori piezoelettrici noti non hanno un'ampia applicazione.

Quindi, compito dell'invenzione è di mettere a disposizione un rilevatore di materiali biologici che possa essere integrato facilmente, abbia elevata sensibilità, bassi costi di fabbricazione ed elevata affidabilità.

Secondo la presente invenzione, sono forniti un dispositivo per il rilevamento elettronico di materiali biologici e il suo processo di fabbricazione, come definiti nelle rivendicazioni 1 e 11, rispettivamente.

Per la comprensione della presente invenzione ne vengono ora descritte forme di realizzazione preferite, a puro titolo di esempio non limitativo, con riferimento ai disegni allegati, nei quali:

Le figure 1a, 1b sono viste in elevazione frontale

e laterale di un rilevatore noto;

La figura 2 è una vista dall'alto del rilevatore delle figure 1a, 1b;

La figura 3 è una vista in sezione trasversale, ingrandita, di una forma di realizzazione del presente dispositivo di rilevamento;

La figura 4 mostra una vista in sezione trasversale, ingrandita, di un substrato semiconduttore, in una fase di fabbricazione del dispositivo di figura 3;

La figura 5 è una vista prospettica della struttura di figura 4;

La figura 6 mostra una vista in sezione trasversale, ingrandita, del substrato di figura 4, in una fase di fabbricazione successiva;

La figura 7 è una vista prospettica, parzialmente interrotta, di una matrice di sonde secondo la figura 3;

La figura 8 è uno schema a blocchi semplificato di una unità di rilevamento di ibridizzazione secondo una forma di realizzazione dell'invenzione;

La figura 9 è una sezione trasversale semplificata di un chip integrante una forma di realizzazione del presente dispositivo di rilevamento; e

La figura 10 è uno schema a blocchi semplificato

di un apparecchio di rilevamento di ibridizzazione utilizzando il chip di figura 9.

La figura 3 mostra uno spot o cella sonda 20 integrata in un corpo 21 di materiale semiconduttore, ad es. silicio monocristallino, avente una cavità sepolta 22 delimitante il fondo di una membrana 23, pure di silicio monocristallino.

Uno strato buffer 25, ad es. di nitruro di alluminio (AlN), si estende sulla membrana 23 ed un elettrodo inferiore 26, per esempio di molibdeno, si estende sullo strato buffer 25. In questa forma di realizzazione, lo strato buffer 25 può avere uno spessore di 30-100 nm, ad es. 50 nm, e l'elettrodo inferiore 26 può avere uno spessore di 50-150 nm, ad es. 100 nm.

Una regione piezoelettrica 27 si estende sull'elettrodo inferiore 26 e ha qui un'area minore dell'elettrodo inferiore 26, per permetterne la connessione elettrica a massa, qui attraverso un filo schermato 28. La regione piezoelettrica 27 ha uno spessore di 0.5-3 μm , ad es. di circa 1 μm , e un diametro di 100-300 μm .

Un elettrodo superiore 30, ad esempio di molibdeno con uno spessore di 50-150 nm, ad es. 100 nm, si estende sulla regione piezoelettrica 27. L'elettrodo

superiore 30 può avere la stessa area o area inferiore alla regione piezoelettrica 27 ed è elettricamente connesso, ad es. attraverso un filo schermato 31, ad un oscillatore 32, di tipo noto e quindi non mostrato in dettaglio.

Una regione di bond 33, ad es. di NiPdAu, si estende sull'elettrodo superiore 30 ed è coperta da uno strato di rilevamento 34, ad es. uno strato sonda di DNA biotinilato includente frammenti sonda 35. Uno strato di protezione 37 si estende sulla superficie della cella sonda 20, tranne che sullo strato di rilevamento 34 e sulle piazzole per i fili 28, 31. Lo strato di protezione è scelto in modo opportuno, in base all'analita che deve essere rilevato, e nella tecnica sono noti molti materiali di passivazione.

Nella forma di realizzazione mostrata, la membrana 23, la regione piezoelettrica 27 e le regioni sovrastanti 30, 33, 34 possono avere forma a disco, ma sono anche possibili altre forme.

La presenza della membrana 23 sotto la regione piezoelettrica 27 consente alla cella sonda di operare ad una frequenza che può essere facilmente trattata dalla circuiteria di controllo associata implementata utilizzando tecniche di fabbricazione standard. Nella cella sonda 20 delle figure 3 e 7, la membrana 23 opera

come ammortizzatore di oscillazioni, abbassando la frequenza di risonanza nel campo dei MHz. Ad esempio, con una membrana 23 avente uno spessore di 20 μm , la regione piezoelettrica 27 avente uno spessore di 1 μm e strati 25, 26, 30 e 33 aventi uno spessore totale di circa 400 nm, è possibile ottenere una frequenza di oscillazione f_0 di circa qualche centinaia di MHz, ad esempio 200 MHz.

Il funzionamento della cella sonda 20 di figura 3 è il seguente. Il circuito formato dalla regione piezoelettrica 27 e dall'oscillatore 32 è un risonatore elettronico avente una frequenza propria di oscillazione dipendente dalla massa a riposo della porzione oscillante della cella sonda 20. A sua volta, la massa a riposo della cella sonda 20 dipende dal numero di frammenti sonda 35 nello strato di rilevamento 34. Ad esempio, ancorando 5000 filamenti/ μm^2 ciascuno avente una lunghezza di 25 basi (25 bp), considerando che ciascun segmento DNA ha una massa di 1.38×10^{-20} g, con un'area sensibile con diametro di 100 μm , la massa prima dell'ibridizzazione è circa 5.4×10^{-13} g.

Assumendo che l'efficienza di ibridizzazione (numero di segmenti bersaglio che si legano con i frammenti sonda 35) è circa 50% e che i segmenti

bersaglio hanno 150-400 bp, la massa finale della cella sonda 20 può essere stimata a circa $1.6-4.3 \times 10^{-12}$ g.

In tale situazione, si ottiene un cambiamento di massa $\Delta m = 1-4$ picogrammi per ciascuna cella sonda 20.

Quando DNA bersaglio si lega con i frammenti sonda 35, il risonatore subisce una variazione della frequenza di oscillazione Δf , secondo l'equazione (1).

Assumendo un rumore a 27 Hz, da considerazioni teoriche segue che la risoluzione della cella sonda 20 è circa 0,5 picogrammi. Quindi, un dispositivo includente anche solo quattro celle sonda 20 è in grado di rilevare ogni ibridizzazione.

La cella sonda 20 ha una sensibilità molto elevata, grazie alla sua piccola area, secondo l'equazione (2). Inoltre, può essere fabbricata usando fasi di fabbricazione tipiche di dispositivi integrati a semiconduttore, e quindi, a basso costo, consentendo il suo uso in molte applicazioni.

La cella sonda 20 può essere realizzata utilizzando sostanzialmente il processo descritto nelle domande di brevetto europeo EP-A-1 324 382, per la realizzazione di una fetta SOI, e il processo descritto nella domanda di brevetto europeo EP-A-1577656, per la realizzazione di un sensore di pressione.

In dettaglio, come mostrato in figura 4, una

maschera 40 viene depositata su un substrato 41 di materiale semiconduttore, ad esempio di silicio, che viene attaccato chimicamente in modo anisotropo dry in modo da formare una pluralità di trincee 42 aventi larghezza, ad esempio, di 1 μm comunicanti tra loro e delimitanti una pluralità di colonne 43 di sezione sostanzialmente esagonale, come visibile dalla figura 5. Ad esempio, le trincee 42 possono avere una profondità di $11 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$ e le colonne 43 possono avere diametro di 2 μm .

Quindi, viene eseguita una crescita epitassiale come descritto nei brevetti citati sopra. Di conseguenza, uno strato epitassiale 44 cresce al di sopra delle colonne 43 e chiude superiormente le trincee 42.

Viene quindi eseguita una fase di annealing termico, ad esempio per 25-30 minuti a circa 1200°C , preferibilmente in atmosfera di idrogeno. In alternativa, può essere utilizzato azoto, utilizzando tempi più lunghi e opportuni strati protezione.

Come discusso nelle succitate domande di brevetto, la fase di annealing provoca una migrazione degli atomi di silicio che tendono a portarsi nella configurazione di minore energia. Di conseguenza, con una scelta opportuna della larghezza delle trincee 42 è possibile

far sì che gli atomi di silicio migrino completamente dalle porzioni delle colonne 43, formando la cavità sepolta 22, come mostrato in figura 64. Al di sopra della cavità sepolta 22 rimane uno strato di silicio, formata la membrana 23 di spessore pari ad esempio 20 μm , costituito in parte da atomi di silicio cresciuti epitassialmente ed in parte da atomi di silicio migrati. Si forma così il corpo 21.

Su una fetta così ottenuta possono essere integrati i componenti elettronici dell'oscillatore e di eventuali altri circuiti elettronici associati. Quindi, in un esempio, viene depositato lo strato di buffer 25, preferibilmente per sputtering a radiofrequenza. Lo strato di buffer 25, ad esempio AlN, ha lo scopo di ottimizzare la qualità dello strato di molibdeno formante l'elettrodo inferiore 26 e, di conseguenza, la successiva crescita dello strato piezoelettrico destinato a formare le regioni piezoelettriche 27. Lo strato di buffer 25 può essere lasciato su tutta la superficie della fetta, o essere definito in modo da formare una regione di buffer 25, estendentesi solo sotto la regione piezoelettrica 27.

Quindi, viene depositato un primo strato di elettrodo, ad esempio molibdeno. L'uso del molibdeno si è dimostrato particolarmente vantaggioso per le

performance della cella sonda 20. Infatti, l'effetto piezoelettrico di un dato strato piezoelettrico dipende dalla qualità di orientazione dello strato piezoelettrico stesso lungo l'asse cristallografico, perpendicolarmente al piano di crescita. Strati piezoelettrici policristallini altamente orientati hanno proprietà piezoelettriche simili a quelle degli strati epitassiali, con il vantaggio di poter essere depositati a temperature più basse. Studi della richiedente hanno dimostrato che il molibdeno è più efficace dell'alluminio nel formare strati piezoelettrici di AlN altamente orientati, quindi l'uso del molibdeno contribuisce ad ottenere un'elevata sensibilità della cella sonda 20.

Il primo strato di elettrodo 26 può coprire tutta la superficie della fetta, almeno nella zona delle sonde, dato che esso definisce un elettrodo di massa, comune a tutte le celle sonda 20, e può essere eventualmente utilizzato come livello di metallizzazione per la circuiteria associata, collegato alle piste di alluminio standard.

Successivamente, uno strato piezoelettrico, preferibilmente AlN, viene depositato per sputtering e definito, in modo da ottenere una regione piezoelettrica 27. In alternativa, lo strato

piezoelettrico può essere lasciato nell'area delle sonde, in modo da evitare la presenza di un gradino durante la deposizione del successivo strato di elettrodo superiore 30. Dopo il deposito dello strato di elettrodo superiore 30, preferibilmente di molibdeno, questo viene definito tramite usuali tecniche fotolitografiche, in modo da formare l'elettrodo superiore 30.

In alternativa a quanto sopra descritto, è possibile definire gli strati degli elettrodi superiore ed inferiore 30, 26 e lo strato piezoelettrico 27 in sequenza, solo dopo la deposizione dello strato di elettrodo superiore 30.

Quindi, la regione di bond 33, ad es. di NiPdAu, viene depositata sull'elettrodo superiore 30 e definita; lo strato di protezione 37, ad esempio di nitruro, viene depositato sull'intera superficie della fetta e rimosso dalle aree dove devono essere formate la regione di rilevamento 34 e le piazzole.

La fetta viene tagliata per ottenere una pluralità di "dice" e l'associata circuiteria (indicata generalmente da 38); quindi i fili 28, 31, ad es. Au, vengono saldati e schermati, ad es. Crescendo uno strato di protezione di plastica non conduttiva (ad es. la plastica nota come "glob top"). Infine, viene

deposto lo strato di rilevamento 34, ad es. per spotting.

Nello stesso chip può essere integrata una pluralità di celle sonda 20, disposte secondo una matrice. La figura 7 mostra una forma di realizzazione includente un chip 50 integrante una pluralità di celle sonda 20, ad esempio 6x21 celle sonda 20 (solo tre delle quali sono visibili). Le celle sonda 20 hanno la struttura mostrata in figura 3, dove sono rappresentate schematicamente, il numero 51 identificando la porzione piezoelettrica sensibile. In questa forma di realizzazione, l'elettrodo inferiore 26 copre l'intera superficie delle celle sonda 20. In alternativa, lo strato dell'elettrodo inferiore 26 può essere definito in modo da formare piazzole e linee di interconnessione verso la circuiteria associata, interna e esterna (figura 8).

Il chip 50 è fabbricato come discusso sopra. In particolare, le trincee 42 sono configurate in modo da ottenere una pluralità di cavità 22, l'elettrodo inferiore 26 e la regione piezoelettrica 27 possono essere comuni a tutte le celle sonda 20 o possono essere definite in modo da formare una pluralità di regioni 26, 27, come mostrato in figura 7, e il chip finale comprende una pluralità di celle sonda 20.

In uso, viene misurata la frequenza di risonanza di ciascuna cella sonda 20, dopo la funzionalizzazione degli elettrodi e prima dell'ibridizzazione. Quindi, dopo avere esposto le celle sonda 20 al fluido che deve essere analizzato, la frequenza di risonanza di ciascuna cella sonda 20 viene misurata nuovamente e comparata con il valore precedente: se la frequenza di risonanza cambia, è avvenuta l'ibridizzazione. In questo modo, può essere rilevata e quantificata la presenza di frammenti di DNA complementari alle sonde nella miscela campione.

La figura 8 mostra un'unità di rilevamento di ibridizzazione 55 comprendente una scheda 58 supportante il chip 50. Il chip 50 integra una matrice di celle sonda 20, e componenti elettronici associati, includenti uno stadio oscillatore 56, avente una pluralità di oscillatori 32, uno per ogni cella sonda 20, e un convertitore 57, ad esempio un contatore. Lo stadio oscillatore 56 pilota la matrice di celle sonda 20 e genera una pluralità di segnali periodici (treni di impulsi) aventi frequenze a riposo f_1 , f_2 , ..., f_n dei risonatori 32; il contatore 57 conta il numero N di impulsi per ciascun segnale in un intervallo di tempo fisso T e genera segnali digitali codificanti le loro frequenze di oscillazione f , il cui valore dipende dal

fatto che i frammenti sonda 35 si siano legati o meno con i rispettivi analiti.

L'uscita del chip 50 è collegata ad un microcontrollore 60 a sua volta collegato ad una memoria 61, ad esempio una EEPROM, ad un generatore di alimentazione 62 e ad uno stadio di ingresso/uscita 63. Il microcontrollore 60 è quindi in grado di rilevare qualunque differenza di frequenza Δf per ciascuna cella sonda 20 e, quindi, la sua ibridizzazione.

Se le singole celle sonda 20 sono funzionalizzate con differenti frammenti sonda 35, e usando configurazioni memorizzate nella memoria 61, è possibile rilevare la presenza di analiti complessi, aventi sequenze in grado di legarsi con i differenti frammenti sonda. Con sonde di sufficiente complessità, è addirittura possibile determinare la sequenza di molecole bersaglio assemblando i dati di ibridizzazione per fornire una sequenza completa.

In alternativa, se tutte le celle sonda 20 sono state funzionalizzate con gli stessi segmenti sonda, è possibile rilevare concentrazioni di analiti estremamente basse.

Secondo un'altra forma di realizzazione, figure 9 e 10, la matrice di celle sonda 20 e la circuiteria associata 38 formano un dispositivo integrato

microfluidico 66 comprendente un serbatoio campioni 67, un serbatoio reagenti 68 (figura 10), un canale di preparazione campioni 69, una camera di amplificazione 70, e una camera di rilevamento 71, tutti in collegamento fluidico.

Il dispositivo microfluidico 66 è anche dotato di una micropompa, qui non illustrata, per far avanzare il campione biologico e i reagenti dai serbatoi 67, 68 verso la camera di rilevamento 71, ad es. disposta a valle.

Il serbatoio campioni 67 e il serbatoio reagenti 68 sono aperti su una superficie del dispositivo microfluidico 66, in modo da essere accessibili dall'esterno.

Il canale di preparazione campioni 69 può comprendere una cella dielettroforetica e una camera per la lisi (non mostrate), per separare cellule nucleate del campione biologico da cellule non nucleate e filtrare via le cellule non nucleate.

Riscaldatori 72 possono essere disposti sulla superficie del dispositivo microfluidico 66 e possono essere pilotati da un'unità di controllo (ad es. un'unità di elaborazione 83 in figura 10), allo scopo di riscaldare e raffreddare la camera di amplificazione 70 secondo un predeterminato profilo di temperatura

(termociclatura).

La camera di rilevamento 71 può alloggiare una matrice di celle sonda 20, ad es. come mostrato in figura 7.

Il dispositivo microfluidico 66 può essere chiuso superiormente da una lastra o pannello 73 (ad es. un vetrino), incollata al chip 50.

In una applicazione del dispositivo, possono essere rilevate sequenze di acidi nucleici particolari usando sonde oligonucleotidiche. Un campione di materiale biologico grezzo (ad es. sangue) viene introdotto nel serbatoio campioni 67 e viene fatto avanzare verso il canale di preparazione campioni 69. Dopo la separazione di cellule nucleate (ad es., cellule bianche del sangue), il campione biologico viene combinato con reagenti per la lisi e la PCR, che sono forniti dal serbatoio reagenti 68. Quindi, il campione biologico e i reagenti vengono miscelati, i nuclei delle cellule vengono rotti chimicamente e viene estratto il DNA. Il DNA viene denaturato termicamente e amplificato nella camera di amplificazione 70 e, infine, il campione biologico trattato viene fornito alla camera di rilevamento 71, per l'ibridizzazione di sequenze nucleotidiche bersaglio e il loro rilevamento, come discusso in precedenza.

Secondo la figura 10, il dispositivo microfluidico 66 è montato su una cartuccia 75 che deve essere caricata in un apparecchio per le analisi biochimiche 80. L'apparecchio 80 comprende l'unità di elaborazione 83, un generatore di alimentazione 84 controllato dall'unità di elaborazione 83, un visualizzatore 85, un lettore 88 e un'unità di raffreddamento 86. La cartuccia 75 comprende una scheda 76 supportante il dispositivo microfluidico 66 e un'interfaccia 77 e può essere inserito amovibilmente nel lettore 88, per l'accoppiamento selettivo all'unità di elaborazione 83 e al generatore di alimentazione 84. I riscaldatori 72 sono accoppiati al generatore di alimentazione 84 attraverso l'interfaccia 77. In alternativa, i riscaldatori 72 possono essere previsti sulla scheda 76 o integrati nel lettore 88. L'unità di raffreddamento 86 può essere un modulo di Peltier o una ventola, controllata dall'unità di elaborazione 83 e termicamente accoppiata alla cartuccia 75 quando inserita nel lettore 88.

I vantaggi del presente dispositivo di rilevamento ibridizzazione sono chiari da quanto sopra.

In particolare, il presente dispositivo ha elevata sensibilità, grazie alla sua integrazione in un chip semiconduttore di dimensioni ridotte, e all'uso di

molibdeno in contatto con la regione piezoelettrica 27.

La formazione della membrana 23 sopra la cavità sepolta 22 consente la fabbricazione della cella sonda 20 utilizzando tecniche semplici e economiche, quindi la cella ha bassi costi di fabbricazione complessivi. Infatti, il fatto di formare la membrana con la tecnica descritta consente di ottenere uno spessore uniforme e ben controllabile per una massa oscillante.

La definizione della membrana 23 attraverso la cavità sepolta 22 consente un controllo semplice e preciso dello spessore della membrana 23, in aggiunta allo spessore degli strati sovrastanti, senza la necessità di calibrazione specifica e/o costosa della frequenza di oscillazione.

La definizione della membrana 23 attraverso la cavità sepolta 22 fa sì che l'intera cella sonda 20 abbia sostanzialmente la stessa area della porzione piezoelettrica e di rilevamento 51. Di conseguenza, ciascuna cella sonda 20 ha area ridotta, il che consente l'integrazione di una pluralità di celle sonda 20 nello stesso chip, quindi usando gli stessi stadi associati di pilotaggio e controllo.

Infine, è chiaro che al dispositivo di rilevamento qui descritto ed illustrato possono essere apportate modifiche e varianti, tutte rientranti nell'ambito

protettivo della presente invenzione, come definito nelle rivendicazioni allegate.

Ad esempio, sebbene la soluzione mostrata integri sia la porzione di rilevamento sia gli elementi di pilotaggio (oscillatori, convertitori) nello stesso chip, questi elementi possono essere integrati in un differente chip, supportato sulla stessa scheda 76 come il dispositivo di rilevamento o alloggiati ad es. nell'apparecchio 80. Viceversa, parte dei componenti elettronici di elaborazione dei segnali elettronici generati dal convertitore 57 possono essere integrati nello stesso chip delle celle sonda, se così desiderato e possibile alla luce delle temperature utilizzate.

In aggiunta, il sensore è stato esemplificato qui usando sonde DNA legate al sensore attraverso un'interazione biotina-streptavidina. Tuttavia, ci sono molti leganti e/o sostanze chimiche disponibili per il legame selettivo di sonde oligonucleotidiche ai substrati, che non vengono dettagliati qui (si veda, ad es., Immobilisation di DNA on Chips II in Topics in Current Chemistry, Vol. 261 (2005), Microarrays (Humana Press, 2007)).

Inoltre, il sensore può essere utilizzato anche per il rilevamento di altre molecole biologiche. Ad esempio, le sonde possono essere anticorpi, che possono

essere depositati selettivamente da leganti e/o sostanze chimiche note (si veda ad es., Protein Microarray Technology (Wiley-VCH 2004), Protein Arrays, Biochips e Proteomics (CRC 2003), Protein Microarrays (Jones & Bartlett Publishers, 2005) o attraverso i coniugati biotina-streptavidina ben noti e esemplificati. Con una sonda anticorpo, può essere rilevato un numero infinito di peptidi, proteine, lipidi, carboidrati e simili. La sonda può anche essere un ligando (ad es., uno steroide), un recettore o altra proteina, un substrato per una proteina, un aptamero, o qualunque altra molecole con elevata affinità con l'analita di interesse.

RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo di rilevamento ibridizzazione, comprendente una cella sonda (20) avente un corpo (21) di materiale semiconduttore formante una membrana (23), un primo elettrodo (26) sulla membrana, una regione piezoelettrica (27) sul primo elettrodo, un secondo elettrodo (30) sulla regione piezoelettrica e uno strato di rilevamento (34) sul secondo elettrodo, caratterizzato dal fatto che il corpo alloggia una cavità sepolta (3) disposta al di sotto e delimitante una superficie inferiore della membrana.

2. Dispositivo secondo la rivendicazione 1, in cui il primo elettrodo (26) è di molibdeno.

3. Dispositivo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il secondo elettrodo (30) è di molibdeno.

4. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, comprendente inoltre un circuito oscillante (19) collegato alla regione piezoelettrica (27) attraverso il primo e il secondo elettrodo (26, 30), il circuito oscillante formando, insieme con la regione piezoelettrica (27), un circuito risonante.

5. Dispositivo secondo la rivendicazione 4, in cui il circuito oscillante (19) è integrato nel corpo (21).

6. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, comprendente inoltre uno strato

buffer (25) estendentesi fra il corpo (21) e il primo elettrodo (26).

7. Dispositivo secondo la rivendicazione 6, in cui la regione piezoelettrica (27) e lo strato buffer (25) sono di nitruro di alluminio.

8. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui lo strato di rilevamento comprende un oligonucleotide o un anticorpo.

9. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, comprendente una pluralità di celle sonda secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui il corpo (21) alloggia una pluralità di cavità distinte (22) ciascuna sottostante una rispettiva pluralità di regioni piezoelettriche (27).

10. Dispositivo microfluidico (66) alloggiante una pluralità di dispositivi di rilevamento ibridizzazione 20 secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9, il dispositivo microfluidico comprendendo inoltre un serbatoio campioni (67), un serbatoio reagenti (68), un canale di preparazione campioni (69), una camera di amplificazione (70), e una camera di rilevamento (71), in collegamento fluidico reciproco.

11. Procedimento per la fabbricazione di un dispositivo di rilevamento ibridizzazione, comprendente:

fornire una fetta (21) di materiale semiconduttore avente una superficie (4);

formare una cavità sepolta (22) all'interno della fetta, formando in tal modo una membrana (23) fra la cavità sepolta e la superficie,

formare un primo elettrodo (26) sulla membrana,

formare una regione piezoelettrica (27) sul primo elettrodo,

formare un secondo elettrodo (30) sulla regione piezoelettrica, e

formare uno strato di rilevamento (34) sul secondo elettrodo.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 11, in cui almeno un elettrodo fra il primo e il secondo elettrodo (26, 30) è di molibdeno.

13. Procedimento secondo la rivendicazione 11 o 12, comprendente inoltre formare un circuito oscillante (32) all'interno del corpo (21) e collegare il circuito oscillante alla regione piezoelettrica (27).

14. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 11-13, comprendente inoltre formare uno strato buffer (25) sul corpo (21), sotto il primo elettrodo (26), la regione piezoelettrica (27) e lo strato buffer (25) essendo di nitruro di alluminio.

15. Procedimento secondo una qualsiasi delle

rivendicazioni 11-14, in cui lo strato di rilevamento
comprende un oligonucleotide o un anticorpo.

p.i.: STMICROELECTRONICS S.R.L.

Elena CERBARO

Elena CERBARO
(Iscrizione Albo nr. 426/BM)

CLAIMS

1. A hybridization detecting device, comprising a probe cell (20) having a body (21) of semiconductor material forming a diaphragm (23), a first electrode (26) on the diaphragm, a piezoelectric region (27) on the first electrode, a second electrode (30) on the piezoelectric region and a detection layer (34) on the second electrode, characterized in that the body accommodates a buried cavity (3) arranged underneath and delimiting a bottom surface of the diaphragm.

2. A device according to claim 1, wherein the first electrode (26) is of molybdenum.

3. A device according to claim 1 or 2, wherein the second electrode (30) is of molybdenum.

4. A device according to any of claims 1-3, further comprising an oscillating circuit (19) connected to the piezoelectric region (27) through the first and second electrodes (26, 30), the oscillating circuit forming, together with the piezoelectric region (27), a resonant circuit.

5. A device according to claim 4, wherein the oscillating circuit (19) is integrated in the body (21).

6. A device according to any of claims 1 to 5, further comprising a buffer layer (25) extending

between the body (21) and the first electrode (26).

7. A device according to claim 6, wherein the piezoelectric region (27) and the buffer layer (25) are of aluminum nitride.

8. A device according to any of claims 1-7, wherein the detection layer comprises an oligonucleotide or an antibody.

9. A device according to any of claims 1-8, comprising a plurality of probe cells according to any of claims 1-8, wherein the body (21) accommodates a plurality of distinct cavities (22) underlying each a respective plurality of piezoelectric regions (27).

10. A microfluidic device (66) accommodating a plurality of hybridization detecting devices 20 according to any of claims 1-9, the microfluidic device further comprising a sample reservoir (67), a reagents reservoir (68), a sample preparation channel (69), an amplification chamber (70), and a detection chamber (71), in mutual fluidic connection.

11. A process for manufacturing a hybridization detecting device, comprising:

providing a wafer (21) of semiconductor material having a surface (4);

forming a buried cavity (22) within the wafer, thereby forming a diaphragm (23) between the buried

cavity and the surface,

forming a first electrode (26) on the diaphragm,

forming a piezoelectric region (27) on the first electrode,

forming a second electrode (30) on the piezoelectric region, and

forming a detection layer (34) on the second electrode.

12. A process according to claim 11, wherein at least one electrode between the first and the second electrode (26, 30) is of molybdenum.

13. A process according to claim 11 or 12, further comprising forming an oscillating circuit (32) within the body (21) and connecting the oscillating circuit to the piezoelectric region (27).

14. A process according to any of claims 11-13, further comprising forming a buffer layer (25) on the body (21), below the first electrode (26); the piezoelectric region (27) and the buffer layer (25) being of aluminum nitride.

15. A process according to any of claims 11-14, wherein the detection layer comprises an oligonucleotide or an antibody.