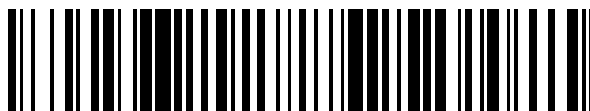


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 104**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2004** **E 04773462 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012** **EP 1691196**

54 Título: **Chip de matriz de micropocillos y su método de fabricación**

30 Prioridad:

25.09.2003 JP 2003333363

29.09.2003 JP 2003336771

29.09.2003 JP 2003336793

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

04.07.2013

73 Titular/es:

TOYAMA PREFECTURE (50.0%)

1-7, Shinsogawa Toyama-shi

Toyama 930-8501, JP y

VIVALIS (50.0%)

72 Inventor/es:

MURAGUCHI, ATSUSHI;

KISHI, HIROYUKI;

TOKIMITSU, YOSHIHARU;

KONDO, SACHIKO;

OBATA, TSUTOMU;

FUJIKI, SATOSHI;

YOKOYAMA, YOSHIYUKI;

NABESAWA, HIROFUMI;

TAKABAYASHI, SOTOHIRO y

TANINO, KATSUMI

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 411 104 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

Chip de matriz de micropocillos y su método de fabricación

5 Campo técnico

El aspecto I de la presente invención se refiere a un chip de matriz de micropocillos que se puede usar para detectar células orgánicas tales como linfocitos específicos de antígeno. En particular, el aspecto I de la presente invención se refiere a un chip de matriz de micropocillos en el que se determina fácilmente la posición de un micropocillo dado.

10 El aspecto II de la presente invención se refiere a un chip de matriz de micropocillos, y un método para la fabricación del mismo, que tenga una buena eficacia de recogida de células orgánicas y una eficacia de recuperación de células orgánicas de los micropocillos.

15 El aspecto III de la presente invención se refiere a un chip de matriz de micropocillos fabricado de silicio que se puede usar para detectar células orgánicas tales como linfocitos específicos de antígeno. En particular, el aspecto III de la presente invención se refiere a un chip de matriz de micropocillos en el que las células orgánicas almacenadas en micropocillos se pueden recuperar fácilmente según se necesite.

20 Técnica anterior

De forma convencional, se han detectado linfocitos específicos de antígeno añadiendo aproximadamente 200.000 linfocitos a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y cultivando los linfocitos en presencia de antígeno durante de tres días a una semana (Methods of Detecting linfocito Functions", Junichi YANO, Michio FUJIWARA, eds., Chugai Igakusha (1994), "Methods of Conducting Immunity Experiments I, II", Shunsuke ISHIDA, Susumu KONDA, Morosuke MOTO, Toshiyuki HAMAOHKA, eds., Nankodo (1995)). Este método hace posible determinar que un linfocito específico de antígeno está presente dentro de un grupo de aproximadamente 200.000 linfocitos. Sin embargo, no permite la identificación de linfocitos específicos de antígeno individuales presentes dentro del grupo de linfocitos.

30 Por el contrario, en los últimos años se ha desarrollado y puesto en práctica un método en el que se mezclan moléculas de antígeno marcadas con pigmento fluorescente con linfocitos para provocar que el antígeno marcado de forma fluorescente se una a receptores de antígeno sobre los linfocitos específicos de antígeno, y los linfocitos que se han unido al antígeno marcado de forma fluorescente se detectan con un citómetro de flujo (Altman J.D., Moss P.A., Goulder P.J., Barouch D.H., McHeyzer-Williams M.G., Bell J.I., McMichael A.J., Davis M.M. Phenotype analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 274: 94-96, 1996). En este método, se puede identificar un linfocito individual que se ha unido a un antígeno. Además, también es posible separar un linfocito individual que se ha unido a un antígeno.

40 Sin embargo, el método de detección anterior requiere un dispositivo caro y complejo denominado clasificador de células para separación. Además, presenta los siguientes problemas:

(1) es difícil establecer las condiciones en el dispositivo para separación; se requiere una gran destreza para hacer funcionar el dispositivo y para separar las células;

45 (2) debido al gran ruido de fondo, cuando la frecuencia del linfocito específico de antígeno es de un 0,1 por ciento o menor, no se puede detectar el linfocito específico de antígeno;

(3) la eficacia de la separación de células es baja;

50 (4) se requiere tiempo para separar células a baja frecuencia; y

(5) aunque se puede confirmar la unión al antígeno, no se puede analizar la reacción por la que el linfocito se une al antígeno.

55 Se ha desarrollado otro método de detección de linfocitos específicos de antígeno en el que se mezclan moléculas de antígeno unidas a perlas magnéticas con linfocitos para provocar que el antígeno unido a la perla magnética se una a los receptores de antígeno de los linfocitos específicos de antígeno, y se usa un imán para separar los linfocitos específicos de antígeno (Abts H., Emmerich M., Miltenyi S., Radbruch A., Tesch H., CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. Journal of Immunological Methods 125:19-28, 1989).

65 En este método, no se requiere un dispositivo complejo, las células se separan rápidamente, y se puede confirmar la unión del antígeno. Sin embargo, no se puede analizar cómo han reaccionado con el antígeno los linfocitos que se han unido al antígeno (transmisión de señal intracelular, síntesis de ARN, síntesis de proteína, o alguna otra reacción fisiológica de la célula). Además, no se pueden detectar linfocitos específicos de antígeno con una

frecuencia de 0,1 o menor.

Por el contrario, los presentes inventores realizaron varias investigaciones para proporcionar un método para detectar linfocitos específicos de antígeno que no requiere un dispositivo complejo, que separa las células rápidamente, que puede confirmar la unión de antígeno, que puede detectar linfocitos específicos de antígeno de baja frecuencia (0,001 por ciento o más), que permite el análisis de cómo reacciona con el antígeno el linfocito que se ha unido a un antígeno, y permite la separación de linfocitos específicos de antígeno. Los presentes inventores también desarrollaron un método de detección de la especificidad de antígeno de linfocitos individuales y de recuperación de los linfocitos específicos de antígeno que se detectan.

Sin embargo, no se conoce ningún chip de matriz de micropocillos que pueda detectar por separado la especificidad de antígeno de linfocitos individuales y permita la recuperación de los linfocitos específicos de antígeno que se detectaron.

En consecuencia, los presentes inventores realizaron una amplia investigación para proporcionar un chip de matriz de micropocillos que se pudo usar en el método de detección descrito anteriormente y que pudo mantener un linfocito individual en un micropocillo individual. Los presentes inventores fabricaron chips de matriz de micropocillos de prueba en los que los micropocillos de un aproximadamente un tamaño que pueda contener un único linfocito se formaron sobre una superficie de sustrato, y realizaron pruebas en las que los linfocitos se almacenaron (se recogieron) en micropocillos y se recuperaron de los micropocillos. En este proceso, los presentes inventores determinaron que cuando se recuperan linfocitos específicos de antígeno detectados en un chip de matriz en el que se han provisto múltiples micropocillos diminutos, y en particular, cuando se lleva a cabo la detección y recuperación en etapas separadas, la recuperación fiable de linfocitos específicos de antígeno sin error de los micropocillos en los que se habían detectado requirió una determinación fiable de las posiciones de los micropocillos. Esto es, en chips de matriz en los que están dispuestos de forma sencilla múltiples micropocillos, existe un problema porque es difícil determinar fácilmente la posición de un micropocillo específico.

En el proceso anterior, los presentes inventores determinaron además que cuando se lavó el chip de matriz después de recoger los linfocitos en los micropocillos usando una suspensión celular en el transcurso del almacenamiento de los linfocitos en los micropocillos, se produjo un problema porque un gran número de células terminaron fluyendo fuera de los micropocillos, lo que provocó que disminuyera notablemente la eficacia de la recogida y la tasa de llenado.

En consecuencia, el primer objetivo de la presente solicitud es proporcionar un chip de matriz de micropocillos que se preste a su uso en el método de detección descrito anteriormente y que permita el almacenamiento de linfocitos individuales en micropocillos individuales. En particular, el aspecto I de la presente solicitud tiene como objetivo proporcionar un chip de matriz de micropocillos que permita la fácil determinación de las posiciones de múltiples micropocillos diminutos.

El segundo objetivo de la presente solicitud es proporcionar un chip de matriz de micropocillos en el que las células tales como los linfocitos que se han recogido en los micropocillos no tiendan a fluir fuera de los micropocillos durante el lavado posterior.

El tercer objetivo de la presente solicitud es proporcionar un chip de matriz de micropocillos que se preste a su uso en el método de detección descrito anteriormente y que pueda almacenar linfocitos individuales en micropocillos individuales.

En particular, el aspecto III, la presente invención, tiene como su objetivo proporcionar un chip de matriz de micropocillos que permite la fácil recuperación de un linfocito individual almacenado en un micropocillo. El aspecto III de la presente invención tiene el objetivo adicional de proporcionar un chip de matriz de micropocillos que no esté limitado a linfocitos, pero que permite el almacenamiento de una célula orgánica individual en un micropocillo individual.

Descripción de la invención

Para lograr el primer objetivo establecido anteriormente, los inventores describen:

(1) Un chip de matriz de micropocillos en el que están presentes múltiples micropocillos sobre una superficie principal de un sustrato, siendo dichos micropocillos de una forma y tamaño que permita el almacenamiento de sólo una única célula orgánica en cada micropocillo,

en el que están presentes marcadores de micropocillo sobre la misma superficie de sustrato como las aberturas de los micropocillos.

(2) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (1) en el que dichos múltiples micropocillos están dispuestos horizontal y verticalmente en un espaciado idéntico y los marcadores se proporcionan en un número prescrito de

micropocillos.

(3) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (1) o (2) en el que dichos múltiples micropocillos están posicionados sobre una superficie principal de dicho sustrato estando divididos en grupos que comprende cada uno un número prescrito de micropocillos y se proporcionan marcadores de una manera que permite la determinación de la posición de cada grupo.

(4) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (3) en el que el número de micropocillos en cada grupo entra dentro de un intervalo de 10 a 10.000.

(5) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (1) a (4) en el que dicho marcador está compuesto de un material fluorescente o un material reflectante.

(6) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (1) a (5) en el que dicho marcador es un marcador de posicionamiento.

(7) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (1) a (6) en el que dicho sustrato está fabricado de silicio, metal o resina.

(8) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (1) a (7) en el que la forma de dichos micropocillos es cilíndrica, poliédrica compuesta de múltiples superficies, cónica inversa, piramidal inversa, o una combinación de dos o más de las anteriores.

(9) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (1) a (8) en el que el diámetro del círculo más grande que se puede inscribir dentro de la forma plana de los micropocillos entra dentro de un intervalo de 0,5 a 2 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en los micropocillos, y la profundidad de los micropocillos entra dentro de un intervalo de 0,5 a 4 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en los micropocillos.

(10) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (1) a (9) en el que la célula orgánica es un linfocito y el chip de matriz de micropocillos se emplea para detectar linfocitos específicos de antígeno individuales.

(11) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (1) a (10) en el que se proporciona una región hidrófoba de manera que rodee dichas múltiples micropocillos sobre dicha superficie principal.

(12) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (11) en el que dicha región hidrófoba está compuesta de una superficie de silicio o superficie que contiene flúor.

Para lograr el segundo objetivo establecido anteriormente, los inventores describen:

(13) Un chip de matriz de micropocillos que tiene múltiples micropocillos sobre una superficie principal de un sustrato, siendo dichos micropocillos de una forma y tamaño que permita el almacenamiento de sólo una única célula orgánica en cada micropocillo,

en el que están presentes protuberancias en las aberturas de dichos micropocillos para estrechar dichas aberturas.

(14) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (13) en el que dichas protuberancias se forman proporcionando una película sobre la superficie de sustrato que sobresale en las aberturas.

(15) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (13) o (14) en el que el tamaño de las aberturas formadas por dichas protuberancias permite el paso de la célula orgánica que se va a almacenar en el micropocillo.

(16) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (13) a (15) en el que dicho sustrato está fabricado de silicio, metal o resina.

(17) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (14) a (16) en el que la película provista sobre dicha superficie de sustrato es una película de óxido, película de nitruro, película de difusión de impurezas, película de metal o película de resina.

(18) Un método para fabricar el chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (13) que comprende las etapas de:

formar una película sobre al menos una superficie principal de un sustrato;

aplicar un recubrimiento de capa protectora sobre la película que se ha formado;

exponer la superficie de capa protectora a través de una máscara que tiene un patrón de micropocillos y retirar las

partes no curadas de la capa protectora;

grabar las partes expuestas de dicha película y sustrato para fabricar pocillos en forma de una matriz de micropocillos; y

retirar la capa protectora.

(19) El método para fabricar un chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (18)

en el que dicho sustrato está fabricado de silicio, metal o resina.

(20) El método para fabricar un chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (18) o (19) en el que dicha película provista sobre dicha superficie de sustrato es una película de óxido, película de nitruro, película de difusión de impurezas, película de metal o película de resina.

(21) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (13) a (20) en el que se proporciona una región hidrófoba de manera que rodee dichas múltiples micropocillos sobre dicha superficie principal.

(22) El chip de matriz de micropocillos de (21) en el que dicha región hidrófoba tiene una superficie de silicio o superficie que contiene flúor.

Para lograr el tercer objetivo establecido anteriormente, la presente invención se refiere a:

(23) Un chip de matriz de micropocillos fabricado de silicio y que tiene múltiples micropocillos, usándose cada micropocillo para almacenar una célula orgánica de muestra individual,

en el que cada micropocillo es de un tamaño y forma que mantiene sólo una célula orgánica, en el que la superficie interior de dichos micropocillos se recubre con una película de fluorocarbono o una película de óxido de silicio.

(24) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (23) en el que cada uno de dichos micropocillos es de forma cilíndrica, poliédrica compuesta de múltiples superficies, cónica inversa, piramidal inversa, o una combinación de dos o más de las anteriores.

(25) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (23) o (24) en el que el diámetro del círculo más grande que se puede inscribir dentro de la forma plana de los micropocillos entra dentro de un intervalo de 0,5 a 2 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en los micropocillos, y la profundidad de los micropocillos entra dentro de un intervalo de 0,5 a 4 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en los micropocillos.

(26) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (23) a (25) en el que dicha célula orgánica es un linfocito y el chip de matriz de micropocillos se usa para detectar linfocitos específicos de antígeno individuales.

(28) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (23) empleado de modo que se recupere una célula orgánica individual almacenada en un micropocillo individual del micropocillo.

(29) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de (23) a (28) en el que se proporciona una región hidrófoba de manera que rodee dichas múltiples micropocillos sobre dicha superficie principal.

(30) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (29) en el que dicha región hidrófoba tiene una superficie de silicio o superficie que contiene flúor.

La invención también describe:

(31) Un chip de matriz de micropocillos que tiene un micropocillo sobre una superficie principal de un sustrato, en el que se proporciona una región de superficie hidrófoba de manera que rodee dicho micropocillo sobre dicha superficie principal.

(32) El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con (31) en el que dicha región hidrófoba tiene una superficie de silicio o superficie de flúor.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista en plano de un chip de matriz de micropocillos 1a sobre el que se proporcionan tres grupos 1c horizontales y tres verticales de 10 x 10 micropocillos 1b.

La figura 2 es un dibujo descriptivo del método para fabricar un chip de matriz de micropocillos del aspecto I de la

presente invención que tiene un marcador fluorescente en la realización 1.

La figura 3 es una vista en plano de un chip de matriz de micropocillos 3a que tiene un marcador reflectante 3d sobre un sustrato de silicio.

La figura 4 es un dibujo descriptivo del principio reflectante de un marcador reflectante.

La figura 5 es un dibujo descriptivo de (la primera mitad de) el método para fabricar el chip de matriz de micropocillos del aspecto I de la presente invención que tiene un marcador reflectante en la realización 2.

La figura 6 es un dibujo descriptivo de (la segunda mitad de) el método para fabricar el chip de matriz de micropocillos del aspecto I de la presente invención que tiene un marcador reflectante en la realización 2.

Las figuras 7(A) y (B) son una vista superior y una vista de sección transversal lateral, respectivamente, de un chip de matriz que tiene micropocillos 13 en el que las protuberancias no están presentes en las aberturas 13a. Las figuras 7(C), (D), y (E) son una vista superior, una vista de sección transversal lateral y una vista en perspectiva, respectivamente, del chip de matriz en el que las protuberancias 14 formadas a partir de las partes de la película 12' están presentes en las aberturas 13a de los micropocillos 13.

Las figuras 8(A), (B), y (C) son una vista superior, una vista de sección transversal y una vista en perspectiva, respectivamente, del chip de matriz de micropocillos del aspecto II de la presente invención, que difiere del modo de la figura 7. Las protuberancias 14' formadas a partir de partes de la película 12" están presentes en las aberturas 13a del micropocillo 13, y las aberturas formadas por las protuberancias 14' son de forma redonda.

Las figuras 9(A), (B), y (C) son dibujos (vistas de sección transversal lateral) descriptivos de las etapas de fabricación de un chip de matriz de micropocillos que emplean un sustrato de silicio. Los micropocillos de (C) son de forma piramidal inversa, los de (D) son cuadrados, y los de (E) son semiesféricos.

La figura 10 muestra las dimensiones de los diversos componentes del chip de matriz de micropocillos producidos en la realización 3.

La figura 11 es un dibujo esquemático descriptivo de un chip de matriz de micropocillos que tiene una película de fluorocarbono en los pocillos.

La figura 12 es un dibujo descriptivo del método para fabricar un chip de matriz de micropocillos que tiene una película de fluorocarbono en los pocillos de la realización 4.

La figura 13 es un dibujo descriptivo del método para fabricar un chip de matriz de micropocillos que tiene una película de óxido (óxido de silicio) en los pocillos de la realización 5.

La figura 14 es un dibujo esquemático de un chip de matriz de micropocillos que tiene una región hidrófoba provista de manera que rodea los múltiples micropocillos sobre una superficie principal que tiene múltiples micropocillos.

La figura 15 es un dibujo descriptivo del método para fabricar el chip de matriz de micropocillos mostrado en la figura 14.

La figura 16 es un dibujo descriptivo del método para fabricar un chip de matriz de micropocillos provisto de una región hidrófoba.

La figura 17 es una fotografía ampliada de un micropocillo del que la pared interna se ha tratado para que sea lisa en la realización 6.

La figura 18 es una fotografía ampliada de un micropocillo en la abertura del que se forma una protuberancia en la realización 7.

Mejores modos de implementar la invención

[Aspecto 1]

A continuación se describe el aspecto 1 de la presente solicitud.

Chip de matriz de micropocillos

El chip de matriz de micropocillos del aspecto 1 de la presente solicitud tiene múltiples micropocillos sobre una superficie principal de un sustrato. Los micropocillos son de un tamaño y forma que se puede almacenar sólo una célula orgánica por micropocillo. El chip de matriz de micropocillos de la presente invención también tiene

marcadores de micropocillo sobre la misma superficie de sustrato que las aberturas de micropocillo.

Las células orgánicas de muestra anteriores pueden ser linfocitos, por ejemplo. El chip de matriz de micropocillos de la presente invención se puede emplear para detectar linfocitos específicos de antígeno individuales, por ejemplo.

En el chip de matriz de micropocillos del aspecto 1, múltiples micropocillos están dispuestos horizontal y verticalmente en un espaciado idéntico y los marcadores se proporcionan de forma deseable en un número prescrito de micropocillos. En particular, el chip de matriz de micropocillos del aspecto 1 se divide en grupos cada uno compuesto de un número prescrito de micropocillos. Estos grupos se proporcionan sobre la superficie principal del sustrato, y los marcadores se proporcionan de modo que se pueda determinar la posición de cada grupo.

Por ejemplo, la figura 1 muestra una vista en plano de un chip de matriz de micropocillos 1a sobre el que se proporcionan tres grupos 1c horizontales y tres verticales 1c de 10 x 10 micropocillos 1b. Se proporciona un marcador 1d sobre cada una de las cuatro esquinas de los grupos 1c de 10 x 10 micropocillos. También es posible proporcionar marcadores sobre las cuatro esquinas de todo el chip de matriz de micropocillos 1a para distinguir los marcadores proporcionados sobre las cuatro esquinas de cada grupo.

El número de micropocillos que forman un único grupo de micropocillos no está limitado específicamente, y puede variar, por ejemplo, de 10 a 10.000.

Los marcadores se pueden usar de forma sencilla para identificar la posición, o pueden ser números o letras. El uso de marcadores en forma de números o letras no sólo determina la posición de cada grupo, sino que también especifica cada grupo. Esto es, se puede asignar un número a cada grupo.

Los marcadores pueden ser legibles por un microscopio de fluorescencia o escáner de imagen, por ejemplo. Por tanto, están compuestos de forma deseable de un material fluorescente o material reflectante.

Unos ejemplos específicos de materiales fluorescentes son materiales que emiten fluorescencia a una longitud de onda prescrita cuando se excitan por la luz que entra del exterior. De forma deseable, se selecciona un material adecuado para su procesamiento por fotolitografía, una técnica para fabricar circuitos integrados semiconductores que se presta a su uso en películas finas. Ejemplos son las resinas de tipo o-naftoquinona-diazida-novolak, siendo preferida OFPR-800 de Tokyo Ohka Kogyo (K.K.).

Además, como materiales reflectantes se seleccionan un material de sustrato procesado y una película fina formada sobre un sustrato. Procesando el material de sustrato por grabado, prensado o similares se puede formar, por ejemplo, una estructura reflectante que tiene una inclinación con relación a la superficie o un patrón de identificación que tiene caracteres o información. Formando una película fina sobre el material de sustrato y fabricando una estructura con elevaciones y depresiones por procesamiento tal como grabado, es posible formar una estructura reflectante de forma irregular en base a hendiduras y protuberancias diminutas sobre la superficie de la película fina o pendientes en las superficies de borde de la película fina, logrando el mismo efecto que se describe anteriormente.

Cuando se observa la muestra en el micropocillo con fluorescencia, las artes que no emiten fluorescencia son completamente invisibles. Por tanto, para determinar la posición de la muestra sobre el sustrato, se requiere una etiqueta fluorescente.

Ni la forma ni el tamaño de los micropocillos están limitados específicamente. Sin embargo, por ejemplo, la forma del micropocillo puede ser cilíndrica. También puede ser no cilíndrica, tal como un poliedro compuesto de múltiples caras (por ejemplo, un paralelepípedo, columna hexagonal o columna octagonal), un cono invertido, una pirámide invertida (pirámide triangular invertida, pirámide cuadrada invertida, pirámide pentagonal invertida, pirámide hexagonal invertida, o una pirámide poligonal invertida con siete o más ángulos), o tener una forma que combine dos o más de estas formas. Por ejemplo, puede ser parcialmente cilíndrica, tendiendo la parte restante la forma de un cono invertido. En el caso de una forma cónica invertida o piramidal invertida, la boca del micropocillo está en el fondo. Sin embargo, la forma puede ser una en la que una parte de la parte superior de un cono invertido o pirámide invertida esté cortada (caso en el que el fondo del micropocillo es plano). Para formas cónicas y paralelepípedas, el fondo del micropocillo normalmente es plano, pero también son posibles superficies curvadas (convexas o cóncavas). El motivo por el que se fabrica curvado el fondo del micropocillo es el mismo que para formas que consisten en un cono invertido o una pirámide invertida con una parte de la parte superior cortada.

La forma y el tamaño del micropocillo se determinan de forma adecuada en consideración al tipo de célula orgánica (forma, tamaño y similares de la célula orgánica) que se va a almacenar en el micropocillo de modo que estará contenida una célula orgánica individual por micropocillo.

Para garantizar que estará contenida una célula orgánica individual por micropocillo, por ejemplo, el diámetro del círculo más grande que se puede inscribir en la forma plana del micropocillo entra de forma adecuada dentro del intervalo de 0,5 a 2 veces, de forma deseable de 0,8 a 1,9 veces, y preferentemente, de 0,8 a 1,8 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en el micropocillo.

Además, la profundidad del micropocillo entra de forma adecuada dentro de un intervalo de 0,5 a 4 veces, de forma deseable de 0,8 a 1,9 veces, y preferentemente, de 0,8 a 1,8 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en el micropocillo.

5 Para un micropocillo con forma cilíndrica, las dimensiones pueden ser, por ejemplo, un diámetro de 3 a 100 micrómetros. Cuando la célula orgánica es un linfocito B, el diámetro es de forma deseable de 4 a 15 micrómetros. Además, la profundidad puede ser de 3 a 100 micrómetros, y en el caso de que la célula orgánica sea un linfocito B, la profundidad es de forma deseable de 4 a 40 micrómetros. Sin embargo, las dimensiones del micropocillo, como se
10 expone anteriormente, se pueden determinar de forma adecuada en consideración a una proporción deseada del diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en el micropocillo con relación a las dimensiones del micropocillo.

15 El número de micropocillos presentes en un chip de matriz de micropocillos individual no está limitado específicamente. Sin embargo, cuando la célula orgánica es un linfocito y la frecuencia de un linfocito específico de antígeno dado por 10^5 células es de 1 a aproximadamente 500 en el extremo superior, el número de micropocillos puede variar de aproximadamente 2.000 a 1.000.000 por cm^2 , por ejemplo.

20 En el aspecto I, la forma de la superficie de la pared interna del micropocillo es de forma deseable lisa para permitir la retirada homogénea de células. La altura de las depresiones y elevaciones sobre la superficie puede entrar dentro del intervalo de 0 a 1,0 micrómetro, preferentemente un intervalo de 0 a 0,5 micrómetros, y más preferentemente, un intervalo de 0 a 0,1 micrómetros.

25 Pueden existir diferencias en la altura de las depresiones y elevaciones en cualquier posición en la pared interna de un micropocillo. Creando depresiones y elevaciones en una parte de la pared interna de un pocillo que se ha tratado para que sea liso, se puede añadir funcionalidad al pocillo. Por ejemplo, creando una protuberancia de 0,5 a 1 micrómetro en altura en la proximidad de la entrada al pocillo hace que para una célula dentro del pocillo sea difícil fluir fuera durante el lavado. Esto modo corresponde al aspecto II descrito adicionalmente a continuación. Impartiendo protuberancias en la superficie del fondo de un pocillo se permite que una célula esté soportada por las
30 protuberancias y por tanto no entra en contacto con la superficie del fondo del pocillo.

La pared interna de un micropocillo se puede alisar por grabado. De forma adecuada, se pueden seleccionar el grado de vacío en el dispositivo de grabado, el tipo de gas de grabado, las etapas de grabado, y similares. Por ejemplo, cuando se alisa la pared interna de un micropocillo con un dispositivo de grabado Multiplex ASE fabricado por STS Corporation, se seleccionan de forma adecuadamente deseable el tiempo de ciclo del método de la etapa de grabado y la etapa de formación de película protectora. El alisado de la pared interna de un se puede llevar a cabo por grabado en húmedo o combinando una etapa de oxidación en caliente con el grabado de película de óxido.

40 Por ejemplo, cuando se varía la altura de las depresiones y elevaciones en alguna posición en la pared interna de un micropocillo con un dispositivo de grabado Multiplex ASE fabricado por STS Corporation, se puede variar el ciclo de proceso del dispositivo para formar depresiones y elevaciones de altura deseada en posiciones deseadas sobre la pared interna del micropocillo. En el grabado húmedo y similares, esto se puede lograr seleccionado de forma adecuada el tipo, concentración y temperatura de la solución química.

45 También se pueden formar protuberancias en sitios específicos sobre la pared lateral del pocillo por grabado. Por ejemplo, extendiendo el tiempo de ciclo de proceso en una posición en la que se desea la formación de una protuberancia usando un dispositivo de grabado Multiplex ASE fabricado por STS Corporation, se pueden formar una protuberancia de altura deseada a una posición deseada sobre la pared lateral del pocillo. Las protuberancias también se pueden formar seleccionando y variando de forma adecuada las condiciones de grabado en posiciones
50 en las que se desea la formación de protuberancias usando dispositivos de grabado distintos del dispositivo de grabado anterior.

El chip de matriz de micropocillos del aspecto I se puede fabricar de silicio, metal o resina, por ejemplo. Cuando se fabrica de silicio, se puede aplicar sin modificaciones la tecnología de procesamiento de silicio, que actualmente es
55 la tecnología de fabricación establecida para circuitos integrados semiconductores. Por tanto, el uso de silicio es superior al uso de otros materiales desde las perspectivas de las propiedades del microprocesamiento, propiedades de la producción de masa e integración con circuitos analíticos futuros tales como sensores.

Los ejemplos del metal anterior son aluminio, acero inoxidable, cobre, níquel, cromo y titanio.

60 Los ejemplos de la resina anterior son poliimida, polietileno, cloruro de vinilo, polipropileno, policarbonato, acrílico y tereftalato de polietileno.

Se describirá el método para fabricar un chip de matriz de micropocillos fabricada de silicio con marcadores de un
65 material fluorescente.

(1) Una sustancia fluorescente (por ejemplo, Tokyo Ohka OFPR-800) se recubre sobre una superficie principal de un sustrato de silicio. La sustancia fluorescente se puede seleccionar de forma adecuada de entre materiales distintos a Tokyo Ohka OFPR-800 siempre que el material seleccionado tenga las características de absorber la radiación de excitación y liberar energía en forma de fluorescencia en el transcurso de su vuelta desde el estado excitado resultante a un estado de base. Es deseable la capacidad de ser procesado por fotolitografía. Por ejemplo, se puede emplear AZP1350 fabricado por Clariant Corporation.

(2) Un patrón de etiqueta se forma por fotolitografía sobre la superficie y se lleva a cabo un procesamiento de endurecimiento a temperatura elevada (por ejemplo, 180 °C) para incrementar la resistencia de la sustancia fluorescente a disolventes. La temperatura usada en el proceso de endurecimiento se puede seleccionar de forma adecuada en base a la sustancia fluorescente.

(3) Después del procesamiento de endurecimiento, se forma un patrón de micropocillo por fotolitografía y se lleva a cabo el endurecimiento a baja temperatura (no mayor de 100 °C). El patrón de micropocillo se puede determinar de forma adecuada en base a las dimensiones del micropocillo, su disposición y similares. La temperatura de endurecimiento se puede determinar de forma adecuada en base al material de capa fotoprotectora empleado en el patrón de micropocillo.

(4) Los pocillos se forman por grabado seco o similares. De forma adecuada se puede usar un método de grabado seco conocido para formar los pocillos.

(5) La capa fotoprotectora empleada como máscara del patrón de pocillo se retira con un disolvente orgánico tal como acetona. El disolvente orgánico empleado no está limitado a acetona. De forma adecuada, se puede emplear cualquier disolvente orgánico que pueda retirar la capa fotoprotectora.

La retirada de la capa fotoprotectora deja sobre el chip sólo los micropocillos y las etiquetas fluorescentes formadas sobre el sustrato de silicio, proporcionando el chip de matriz de micropocillos del aspecto I.

Se describirá a continuación el método para fabricar un chip de matriz de micropocillos fabricada de silicio con marcadores de un material reflectante.

(1) La fotolitografía se usa para formar un patrón de etiqueta sobre una superficie principal de un sustrato de silicio. Cuando se fabrica una estructura reflectante de una película fina, es necesario formar una película fina de material sobre la misma superficie antes de la fotolitografía.

(2) Una estructura reflectante piramidal invertida se fabrica, por ejemplo, por grabado comprendiendo, por ejemplo, inmersión en solución alcalina que tenga características de grabado de superficie anisótropas. Para una película fina, se selecciona de forma adecuada un método de grabado.

(3) un patrón de micropocillo se forma por fotolitografía. El patrón de micropocillo se determina de forma adecuada en base a las dimensiones y disposición de los micropocillos.

(4) Los pocillos se forman por un método de grabado seco o similar. De forma adecuada se puede usar un método de grabado seco conocido para formar los pocillos.

(5) Una solución de separación de capa fotoprotectora o similar se usa para retirar la capa fotoprotectora.

La retirada de la capa fotoprotectora deja sobre el chip sólo los micropocillos y las etiquetas reflectantes formadas sobre el sustrato de silicio, proporcionando la matriz de micropocillos del aspecto I.

En el chip de matriz de micropocillos del aspecto I, se pueden aprovechar los efectos cuánticos tipificados por fenómenos de barrera de portadores de electrones y huecos, tales como estructuras fotoluminescentes que emplean los efectos de los portadores confinados. El material fotoluminescente empleado se puede seleccionar de forma adecuada en base a la longitud de onda requerida. Una estructura fotoluminescente se puede añadir al chip, o una estructura fotoluminescente se puede construir en el propio chip. Por ejemplo, se pueden formar partículas con efectos cuánticos, materiales porosos, dopados con impurezas, y estructuras de pocillos cuánticas a base de laminación de película fina o se puede formar una película de un material fotoluminescente para proporcionar marcadores sobre el chip de matriz de micropocillos del aspecto I.

Además, el chip de matriz de micropocillos del aspecto I puede tener una región hidrófoba provista de manera que rodea los múltiples micropocillos sobre una superficie principal que tiene múltiples micropocillos. La figura 14 es un diagrama esquemático de un chip de matriz de micropocillos sobre el que se proporciona una región de este tipo. Como se muestra en la figura 14, se proporciona una región hidrófoba de manera que rodee a los micropocillos de modo que la solución que contiene las células y similares que se siembra sobre la matriz de micropocillo no cruce la región hidrófoba y se disperse, permitiendo de este modo una concentración eficaz de la dispersión de células en los micropocillos. Una región de este tipo puede ser plana o puede estar en forma de surco. El número de dichas

regiones no está limitado específicamente. Se puede proporcionar una única región de este tipo, o se pueden proporcionar dos o más. La anchura de esta región se puede establecer de forma adecuada en base a la cantidad de solución que se va a sembrar; por ejemplo, la anchura puede ser de 100 micrómetros a 1 mm. Cuando esta región está en forma de un surco, la profundidad del surco se puede establecer de forma adecuada en base a la cantidad de solución que se va a sembrar; por ejemplo, la profundidad puede ser de 5 a 100 micrómetros.

La región hidrófoba puede tener una superficie de silicio o una superficie que contiene flúor, por ejemplo.

El método para fabricar un chip de matriz de micropocillos sobre el que se proporciona una región hidrófoba de tipo surco que tiene una superficie de silicio, estando fabricado el sustrato de silicio, se describirá a continuación a modo de ejemplo con referencia a la figura 15.

(1) Un recubrimiento de capa protectora positiva a base de resina de novolak OFPR-800 (32c) fabricada por Tokyo Ohka Kogyo (K.K.), por ejemplo, se forma sobre un sustrato de silicio 32b (figura 15(A)) sobre el que se ha formado una película de óxido de silicio 32a, formando así un patrón de micropocillo 32d. En este proceso, el patrón de micropocillo y un patrón 32e que proporciona las regiones hidrófobas de tipo surco se forman simultáneamente (figura 15(B)).

(2) La película de óxido de silicio 32a expuesta se retira del patrón por ácido fluorhídrico (figura 15(C)), y según se necesite, se retira la capa fotoprotectora 32c. Se usa el grabado seco que emplea la implantación de iones o gas a base de flúor o el grabado húmedo que emplea una solución alcalina o ácido fluonítrico, para grabar el silicio. Los micropocillos 32f se forman en este momento. Al mismo tiempo, en la parte en la que se ha formado el patrón 32e, se expone la superficie del silicio hidrófobo, formando regiones hidrófobas de tipo surco 32g (figura 15(D)).

(3) Una vez se ha retirado la capa fotoprotectora, se obtiene un chip de matriz de micropocillos en el que se proporcionan regiones hidrófobas de tipo surco que tienen superficies de silicio que rodean los micropocillos (figura 15(E)).

En la presente invención, la formación de pocillos y el grabado del propio sustrato de silicio como se expone anteriormente puede proporcionar un chip de matriz de micropocillos sobre el que se proporcionan regiones hidrófobas de tipo surco, así como un chip de matriz de micropocillos sobre el que se proporcionan regiones hidrófobas de tipo surco en las que la superficie de silicio se ha expuesto por grabado de película de óxido. Un ejemplo de un método para fabricar un chip de matriz de micropocillos de este tipo se describirá a continuación con referencia a la figura 16.

(1) Un recubrimiento de capa fotoprotectora a base de resina de novolak OFPR-800 (42c) fabricada por Tokyo Ohka Kogyo (K.K.), por ejemplo, se aplica a un sustrato de silicio 42b (figura 16(A)) sobre el que se ha formado una película de óxido de silicio 42a para formar un patrón 42e para proporcionar regiones hidrófobas de tipo surco (figura 16(B)).

(2) La película de óxido de silicio 42a expuesta se retira del patrón con ácido fluorhídrico o similar, exponiendo el silicio (figura 16(C)). Aquí, se retira parte de la capa fotoprotectora.

(3) Un recubrimiento de capa fotoprotectora se aplica de nuevo a la misma superficie de sustrato de silicio para formar el patrón de micropocillo 42d (figura 16(D)). La película de óxido de silicio expuesta se retira con ácido fluorhídrico o similar del patrón que se ha formado.

(4) Se usa grabado seco que emplea la implantación de iones o gas a base de flúor, o grabado húmedo con una solución alcalina o ácido fluonítrico para grabar el silicio (figura 16(E)).

(5) La retirada de la capa fotoprotectora proporciona un chip de matriz de micropocillos sobre el que se proporcionan regiones hidrófobas de tipo surco que tienen superficies de silicio que rodean los micropocillos (figura 16(F)).

En las regiones hidrófobas, pueden estar presentes superficies que contienen flúor. Los ejemplos de superficies que contienen flúor son: superficies de fluorocarbono; superficies de fluororresina compuestas de carbono, flúor, hidrógeno, y similares; y superficies de fluorosilicio. Las regiones hidrófobas que tienen superficies que contienen flúor se pueden proporcionar por los métodos de estampado, impresión, o recubrimiento de un repelente de agua a base de flúor; el método de formación de un surco por grabado, por ejemplo, y que provoca que un repelente de agua a base de flúor fluya dentro del surco; método de inyección de tinta; o método de recubrimiento por pulverización. Las regiones hidrófobas también se pueden proporcionar usando una resina de silicona o resinas de paraxileno tales como parileno. Esto hace posible proporcionar regiones hidrófobas incluso en sustratos fabricados de metal o resina.

Método de uso del marcador

La radiación de excitación empleada en un detector de fluorescencia se refleja de forma irregular por estructuras

reflectantes o una superficie con forma irregular. Puesto que se monta sobre el detector un filtro de paso de banda que elimina normalmente todo menos la longitud de onda de fluorescencia deseada, la luz de excitación totalmente reflejada por la superficie del chip no entra en el detector. Sin embargo, la luz reflejada de forma irregular se refleja en un espejo que tiene las propiedades de un filtro de paso de banda de estado inicial y puede alcanzar el detector.

- 5 En consecuencia, el filtro de paso de banda antes del detector en el estado posterior se retira durante la identificación de etiqueta para permitir que la luz reflejada de forma irregular entre en el detector. La forma del patrón de etiqueta es de forma deseable cóncava en lugar de convexa para facilitar la identificación.

[Aspecto II]

10

El aspecto II de la presente solicitud se describe a continuación.

El chip de matriz de micropocillos

- 15 En el chip de matriz de micropocillos del aspecto II de la presente solicitud, múltiples micropocillos están presentes sobre una superficie principal de un sustrato, los micropocillos son de una forma y tamaño que permiten el almacenamiento de sólo una única célula orgánica en cada micropocillo, y están presentes miembros salientes en las aberturas de los micropocillos para estrechar las aberturas.

- 20 Las protuberancias se pueden formar provocando que una película formada sobre la sustrato de sustrato sobresalga en las aberturas. Sin embargo, las protuberancias no están limitadas a este aspecto. El aspecto de formación de protuberancias de modo que una película provista sobre la superficie de sustrato sobresalga en las aberturas se describirá en base a la figura 7.

- 25 Las figuras 7(A) y (B) son una vista en plano y una vista de sección transversal lateral, respectivamente, de un chip de matriz en el que se proporciona una película 12 sobre la superficie de sustrato 11 y en el que están presentes micropocillos 13. No está presente ninguna protuberancia en la abertura 13a del micropocillo 3.

- 30 Por el contrario, las figuras 7(C), (D), y (E) son una vista en plano, vista de sección transversal lateral, y vista en perspectiva, respectivamente, de un chip de matriz en el que se proporciona una película 12' sobre la superficie de sustrato 11 y están presentes micropocillos 13. Una protuberancia 14 compuesta de una parte de película 12' está presente en la abertura 13a del micropocillo 13.

- 35 Las figuras 8(A), (B), y (C) son una vista en plano, vista de sección transversal lateral, y vista en perspectiva, respectivamente, de otro chip de matriz de micropocillos del aspecto II que difiere del de la figura 7. Las figuras 8(A), (B), y (C) muestran un chip de matriz en el que se proporciona una película 12" sobre la superficie de sustrato 11 y en el que están presentes micropocillos 13, estando presente una protuberancia 14' formada de parte de la película 12" en la abertura 13a del micropocillo 13. La forma de la abertura formada por la protuberancia 14' es redonda, en contraste con la de la figura 7(E) (que es cuadrada).

40

La forma de la abertura formada por la protuberancia puede diferir de la de la protuberancia 14 en la figura 7 y la de la protuberancia 14' en la figura 8. El tamaño de la abertura formada por la protuberancia es adecuado para permitir el paso de la célula orgánica que se va a almacenar en el micropocillo.

- 45 La figura 9 muestra vistas de sección transversal lateral de chips de matriz de micropocillos del aspecto II con formas de micropocillo diferentes.

- 50 En la figura 9(C), que es el mismo aspecto que en las figuras 7 y 8, el micropocillo es una pirámide invertida, mientras que el micropocillo de la figura 9(D) es cuadrado y el de la figura 9(E) es semiesférico. Sin embargo, la forma del micropocillo no está limitada específicamente, y son posibles otras formas distintas a estas.

- 55 Ni la forma ni el tamaño del micropocillo están limitados específicamente. Sin embargo, por ejemplo, la forma del micropocillo puede ser cilíndrica. También puede ser no cilíndrica, tal como un poliedro compuesto de múltiples caras (por ejemplo, un paralelepípedo, columna hexagonal o columna octagonal), un cono invertido, una pirámide invertida (pirámide triangular invertida, pirámide cuadrada invertida, pirámide pentagonal invertida, pirámide hexagonal invertida, o una pirámide poligonal invertida con siete o más ángulos), o tener una forma que combine dos o más de estas formas. Por ejemplo, puede ser parcialmente cilíndrica, tendiendo la parte restante la forma de un cono invertido. En el caso de una forma cónica invertida o piramidal invertida, la boca del micropocillo está en el fondo. Sin embargo, la forma puede ser una en la que una parte de la parte superior de un cono invertido o pirámide invertida esté cortada (caso en el que el fondo del micropocillo es plano). Para formas cónicas y paralelepípedas, el fondo del micropocillo normalmente es plano, pero también son posibles superficies curvadas (convexas o cóncavas). El motivo por el que se fabrica curvado el fondo del micropocillo es el mismo que para formas que consisten en un cono invertido o una pirámide invertida con una parte de la parte superior cortada.

- 65 La forma y el tamaño del micropocillo se determinan de forma adecuada en consideración al tipo de célula orgánica (forma, tamaño y similares de la célula orgánica) que se va a almacenar en el micropocillo de modo que estará

contenida una célula orgánica individual por micropocillo.

Para garantizar que estará contenida una célula orgánica individual por micropocillo, por ejemplo, el diámetro del círculo más grande que se puede inscribir en la forma plana de la abertura formada por la protuberancia provista en la abertura del micropocillo entra de forma adecuada dentro del intervalo de 0,5 a 2 veces, de forma deseable de 0,8 a 1,9 veces, y preferentemente, de 0,8 a 1,8 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en el micropocillo.

Además, la profundidad del micropocillo entra de forma adecuada dentro de un intervalo de 0,5 a 4 veces, de forma deseable de 0,8 a 1,9 veces, y preferentemente, de 0,8 a 1,8 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en el micropocillo.

Para un micropocillo con forma cilíndrica, las dimensiones pueden ser, por ejemplo, un diámetro de 3 a 100 micrómetros. Cuando la célula orgánica es un linfocito B, el diámetro es de forma deseable de 4 a 15 micrómetros. Además, la profundidad puede ser de 3 a 100 micrómetros, y en el caso de que la célula orgánica sea un linfocito B, la profundidad es de forma deseable de 4 a 40 micrómetros. Sin embargo, las dimensiones del micropocillo, como se expone anteriormente, se pueden determinar de forma adecuada en consideración a una proporción deseada del diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en el micropocillo con relación a las dimensiones del micropocillo.

El número de micropocillos presentes en un chip de matriz de micropocillos individual no está limitado específicamente. Sin embargo, cuando la célula orgánica es un linfocito y la frecuencia de un linfocito específico de antígeno dado por 10^5 células es de 1 a aproximadamente 500 en el extremo superior, el número de micropocillos puede variar de aproximadamente 2.000 a 1.000.000 por cm^2 , por ejemplo.

En el aspecto II, como en el aspecto I anterior, la forma de la superficie de la pared interna del micropocillo es de forma deseable lisa para permitir la retirada homogénea de células. Los detalles específicos son idénticos a los dados anteriormente para el aspecto I.

El sustrato del chip de matriz de micropocillos del aspecto II se puede fabricar de silicio, metal o resina, por ejemplo. Cuando se fabrica de silicio, se puede aplicar sin modificaciones la tecnología de procesamiento de silicio, que actualmente es la tecnología de fabricación establecida para circuitos integrados semiconductores. Por tanto, el uso de silicio es superior al uso de otros materiales desde las perspectivas de las propiedades del microprocesamiento, propiedades de la producción de masa e integración con circuitos analíticos futuros tales como sensores.

Los ejemplos del metal que constituye el sustrato son aluminio, acero inoxidable, cobre, níquel, cromo y titanio.

Los ejemplos de la resina que constituye el sustrato son poliimida, polietileno, cloruro de vinilo, polipropileno, policarbonato, acrílico y tereftalato de polietileno.

Los ejemplos de la película provista en la superficie del sustrato son películas de óxido, películas de nitruro, capas de difusión de impurezas, películas de metal, y películas de resina.

Los ejemplos de películas de óxido son películas de óxido de silicio, películas de nitruro y óxido de silicio, películas de óxido de aluminio, y películas de óxido de titanio.

Los ejemplos de películas de nitruro son películas de nitruro y silicio, películas de nitruro y aluminio, y películas de nitruro y titanio.

Un ejemplo de una capa de difusión de impurezas es la distribución de una alta concentración de boro en una superficie de sustrato de silicio.

Los ejemplos de películas de metal son aluminio, oro, platino, acero inoxidable, cobre, níquel, cromo, titanio, germanio, y silicio germanio.

Los ejemplos de las películas de resina son poliimida, polietileno, cloruro de vinilo, polipropileno, policarbonato, acrílico y tereftalato de polietileno.

El grosor de la película proporcionada sobre la superficie de sustrato no está limitado específicamente, y puede variar de desde 100 nm a 5 micrómetros, por ejemplo. De forma deseable entra dentro de un intervalo de 300 nm a 1 micrómetro.

Cuando el sustrato se fabrica de silicio, el tipo de película proporcionado sobre la superficie de sustrato es de forma deseable una película de óxido, película de nitruro, o capa de difusión de impurezas desde la perspectiva de poder aplicarse la tecnología de fabricación de circuito integrado establecida actual como tal y en términos de propiedades de producción de masa, reducción de costes y fiabilidad.

Cuando el sustrato se fabrica de silicio, la película proporcionada sobre la superficie de sustrato es de forma deseable una película de resina desde las perspectivas de la aplicación de fotolitografía, selección de grabado, y propiedades de producción en masa.

5 Cuando el sustrato se fabrica de silicio, la película proporcionada sobre la superficie de sustrato se fabrica de forma deseable de metal desde las perspectivas de la aplicación de fotolitografía, combinación con sensores, durabilidad de la película, y propiedades de producción en masa.

10 Cuando el sustrato se fabrica metal, la película proporcionada sobre la superficie de sustrato se fabrica de forma deseable de metal desde las perspectivas de selección de grabado y potenciación de la resistencia térmica y durabilidad de la película.

15 Cuando el sustrato se fabrica de metal, la película proporcionada sobre la superficie de sustrato se fabrica de forma deseable de resina desde las perspectivas de la aplicación de fotolitografía, selección de grabado, y similares.

20 Cuando el sustrato se fabrica de metal, la película proporcionada sobre la superficie de sustrato es de forma deseable una película de óxido, película de nitruro, o similares desde las perspectivas de facilidad de formación de película y durabilidad y adhesión de la película.

Cuando el sustrato se fabrica de resina, la película proporcionada sobre la superficie de sustrato se fabrica de forma deseable de resina desde las perspectivas de reducción de coste y la capacidad de uso de varias técnicas de formación y procesamiento conocidas en la fabricación.

25 Cuando el sustrato se fabrica de resina, la película proporcionada sobre la superficie de sustrato se fabrica de forma deseable de metal desde las perspectivas de la funcionalidad, procesabilidad, y durabilidad de la película.

El método para fabricar un chip de matriz de micropocillos

30 El chip de matriz de micropocillos del aspecto II se puede fabricar, por ejemplo, por los siguientes métodos.

El método para fabricar un chip de matriz de micropocillos del aspecto II de la presente invención que comprende las etapas de:

35 formar una película sobre al menos una superficie principal de un sustrato;

aplicar un recubrimiento de capa protectora sobre la película que se ha formado;

40 exponer la superficie de capa protectora a través de una máscara que tiene un patrón de micropocillos y retirar las partes no curadas de la capa protectora;

grabar las partes expuestas de dicha película y sustrato para fabricar pocillos en forma de una matriz de micropocillos; y

45 retirar la capa protectora.

El caso en el que el sustrato se fabrica de silicio se describirá a continuación.

50 (1) Una película fina de óxido o similar se forma por un método tal como CVD en caliente o CVD sobre la superficie de un sustrato de silicio que se ha lavado.

(2) La capa protectora se recubre sobre la película fina que se ha formado.

55 (3) La superficie de capa protectora se expone a través de una máscara que tiene un patrón de micropocillo y la parte no curada de la capa protectora se retira. Esto es, un patrón de micropocillo se forma sobre una película fina por fotolitografía, y la superficie de silicio se expone.

60 (4) Las partes expuestas de la película y el sustrato se graban para formar pocillos en forma de una matriz de micropocillos. El grabado se puede realizar, por ejemplo, con solución de grabado alcalina (por ejemplo, TMAH: hidróxido de tetrametilamonio). En este proceso, el grabado avanza en la dirección de la profundidad del sustrato y bajo la película fina. Cuando se lleva a cabo el grabado durante más tiempo que el prescrito, se forma una protuberancia en forma de reborde de película fina en la abertura del micropocillo formado en el sustrato de silicio.

65 (5) La capa protectora se retira para obtener el chip de matriz de micropocillos del aspecto II.

El caso en el que el sustrato se fabrica de metal se describirá a continuación.

(1) Una película fina de resina, o una película fina de metal que tiene selectividad de grabado con el sustrato, se forma sobre la superficie de un sustrato de metal lavado, o la superficie del sustrato de metal se somete a un tratamiento de oxidación o nitruración para formar una película fina.

5

(2) La capa fotoprotectora se recubre sobre la película fina que se ha formado.

(3) La superficie de capa fotoprotectora se expone a través de una fotomáscara que tiene un patrón de micropocillo y la parte no curada de la capa fotoprotectora se retira. Esto es, la fotolitografía se usa para formar un patrón de micropocillo en la película fina, exponiendo la superficie de sustrato.

10

(4) un método tal como grabar las partes expuestas del sustrato se usa para formar pocillos en forma de una matriz de micropocillos. El medio de grabado empleado se selecciona de forma adecuada.

15

(5) Cuando el grabado hacia el fondo se continúa, el área a los lados directamente bajo la película fina también se graba de algún modo, formando una estructura de reborde.

(6) Cuando la capa fotoprotectora se retira, se obtiene el chip de matriz de micropocillos del aspecto II.

20

El caso en el que el sustrato se fabrica de resina se describirá a continuación.

(1) Una película fina de resina o metal se forma sobre un sustrato de resina lavado, o la superficie de resina se modifica para potenciar la durabilidad o similares. La modificación se puede realizar por procesamiento UV, introducción de un material de modificación, o similares.

25

(2) La capa fotoprotectora se recubre sobre la película fina que se ha formado.

(3) La superficie de capa fotoprotectora se expone a través de una fotomáscara que tiene un patrón de micropocillo y las partes no curadas de la capa fotoprotectora se retiran. Esto es, un patrón de micropocillo se forma sobre la película fina por fotolitografía, y la superficie de sustrato se expone.

30

(4) Los pocillos se forman en forma de matriz de micropocillos por un método tal como disolver partes del sustrato expuesto. En este momento, la solución usada para el grabado se selecciona de forma adecuada. De forma alternativa, si el propio sustrato se puede someter a fotolitografía, por ejemplo, se puede exponer a radiación UV usando una máscara en forma de una película fina de metal en un patrón de micropocillo y las partes expuestas se retiran. En este momento, la profundidad de los pocillos se puede controlar por el nivel de exposición UV.

35

(5) Aquí, cuando la disolución hacia el fondo se continúa, el área a los lados directamente bajo la película fina también se graba de algún modo, formando una estructura de reborde.

40

(6) Cuando la capa fotoprotectora se retira, se obtiene el chip de matriz de micropocillos del aspecto II.

El caso en el que se proporciona una película de óxido sobre la superficie de un sustrato de silicio se describirá a continuación.

45

(1) Una película de óxido (película de óxido de silicio o similar) se forma por un método tal como oxidación en caliente, CVD en caliente, o CVD de plasma sobre un sustrato de silicio lavado.

(2) La capa fotoprotectora se recubre sobre la película fina que se ha formado.

50

(3) La superficie de capa fotoprotectora se expone a UV a través de una máscara que tiene un patrón de micropocillo y las partes no curadas de la capa fotoprotectora se retiran. Esto es, la fotolitografía se usa para formar un patrón de micropocillo sobre la película fina, exponiendo la superficie de silicio. La capa fotoprotectora se retira.

55

(4) Los pocillos se forman en forma de matriz de micropocillos grabando la parte expuesta del sustrato. Por ejemplo, el grabado se puede realizar con una solución de grabado alcalina (por ejemplo, TMAH: hidróxido de tetrametilamonio). Cuando el grabado se continúa en la dirección del grosor del sustrato, el grabado también continúa en el área a los lados directamente bajo la película fina. Cuando el grabado se lleva a cabo durante un periodo que excede el periodo convencional, se forman protuberancias en forma de alero de película fina en las entradas a los micropocillos que se han formado sobre la placa de silicio.

60

(5) De este modo se obtiene un chip de matriz de micropocillos del aspecto II.

El caso en el que se proporciona una película fina de metal sobre la superficie de un sustrato de silicio se describirá a continuación.

65

(1) Una película fina de metal se forma sobre un sustrato de silicio por CVD, depósito de vapor en caliente resistente, depósito de vapor por pulverización catódica, depósito de vapor por haz de e, o similares.

(2) La capa fotoprotectora se recubre sobre la película fina que se ha formado.

(3) La superficie de capa fotoprotectora se expone a UV través de una máscara que tiene un patrón de micropocillo y las partes no curadas de la capa fotoprotectora se retiran. Esto es, la fotolitografía se usa para formar un patrón de micropocillo sobre la película fina, exponiendo la superficie de silicio. En este momento, el método de grabado de la película fina para formar el patrón se selecciona de forma adecuada. Por ejemplo, para aluminio, se puede emplear un ácido mezclado de ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido acético y agua. Cuando sea necesario, la capa fotoprotectora se puede retirar.

(4) Los pocillos se forman en forma de matriz de micropocillos grabando las partes expuestas del sustrato. El grabado se puede llevar a cabo con una solución de grabado alcalina, por ejemplo. La solución de grabado se selecciona de forma adecuada. Por ejemplo, cuando se fabrica una estructura en base a una película fina de aluminio, se emplea una solución de grabado que graba silicio pero no aluminio (por ejemplo, se selecciona hidrato de hidracina; la hidracina no corroe la mayoría de los metales). Cuando el grabado se lleva a cabo en la dirección del grosor del sustrato, también continúa a los lados directamente bajo la película fina. Cuando el grabado se lleva a cabo más allá del periodo prescrito, se forman protuberancias en forma de alero de película fina en las entradas a los micropocillos formados sobre el sustrato de silicio.

(5) De este modo se obtiene un chip de matriz de micropocillos del aspecto II.

El caso en el que se proporciona una película fina de resina sobre la superficie de un sustrato de silicio se describirá a continuación.

(1) Una película fina de resina se forma por CVD, recubrimiento, inmersión, o un método similar sobre un sustrato de silicio lavado.

(2) La capa fotoprotectora se recubre sobre la película fina que se ha formado. (3) La superficie de capa fotoprotectora se expone a radiación UV través de una máscara que tiene un patrón de micropocillo y las partes no curadas de la capa fotoprotectora se retiran. Esto es, la fotolitografía se emplea para formar un patrón de micropocillo sobre la película fina, exponiendo la superficie de silicio. En este momento, el método usado para retirar la película fina de resina para formar el patrón se selecciona de forma adecuada. Por ejemplo, cuando se emplea una película fina de poliimida fotosensible, el patrón se puede formar directamente en la película fina de resina que se ha recubierto, de modo que la etapa de aplicación de capa fotoprotectora se puede omitir y la película fina de resina se puede procesar solo por exposición.

(3) Las partes expuestas del sustrato se graban para formar pocillos de forma de matriz de micropocillos. El grabado se puede llevar a cabo, por ejemplo, con una solución de grabado alcalina. La solución de grabado se selecciona de forma adecuada. Por ejemplo, para una película fina de poliimida, se pueden seleccionar hidrato de hidracina o etilendiamina pirocatecol. En este momento, cuando el grabado se lleva a cabo en la dirección del grosor del sustrato, el grabado continúa a los lados directamente bajo la película fina. Cuando el grabado se lleva a cabo más allá del periodo prescrito, se forman protuberancias en forma de alero de película fina en las entradas a los micropocillos formados en el sustrato de silicio.

(4) Esto proporciona un chip de matriz de micropocillos del aspecto II.

El caso en el que se proporciona una película de nitruro de silicio sobre la superficie de un sustrato de silicio se describirá a continuación.

(1) Una película fina de nitruro de silicio se forma por CVD, depósito de vapor por pulverización catódica o similar sobre un sustrato de silicio lavado.

(2) La capa fotoprotectora se recubre sobre la película fina que se ha formado.

(3) La superficie de capa fotoprotectora se expone a UV través de una máscara que tiene un patrón de micropocillo y las partes no curadas de la capa fotoprotectora se retiran. Esto es, la fotolitografía se usa para formar un patrón de micropocillo sobre la película fina, exponiendo la superficie de silicio. La capa fotoprotectora se retira.

(4) Los pocillos se forman en forma de matriz de micropocillos grabando las partes expuestas del sustrato. Por ejemplo, una solución de grabado alcalina (por ejemplo, TMAH: hidróxido de tetrametilamonio) se emplea en el grabado. En este momento, cuando el grabado se lleva a cabo en la dirección del grosor del sustrato, el grabado continúa a los lados directamente bajo la película fina. Aquí, cuando el grabado se lleva a cabo más allá del periodo prescrito, se forman protuberancias en forma de alero de película fina en las entradas a los micropocillos formados sobre el sustrato de silicio.

(5) Esto proporciona un chip de matriz de micropocillos del aspecto II.

El caso en el que se proporciona una capa de difusión de impurezas sobre un sustrato de silicio se describirá a continuación.

(1) La capa fotoprotectora se recubre sobre un sustrato de silicio lavado. (3) La superficie de capa fotoprotectora se expone a UV través de una máscara que tiene un patrón de micropocillo y las partes no curadas de la capa fotoprotectora se retiran. Esto es, la fotolitografía se usa para formar un patrón de micropocillo sobre la película fina, exponiendo la superficie de silicio por todo menos en las partes del patrón de micropocillo.

(2) El sustrato se lava y se difunde una alta concentración de boro (aproximadamente $10^{20}/\text{cm}^2$) en las partes expuestas de silicio por difusión en caliente, implantación de iones, o similares. También se puede emplear una fuente de difusión distinta de boro, tal como germanio o silicio germanio. El grosor de la capa de difusión se puede controlar por un tratamiento térmico (por impulso) para lograr una difusión profunda. En este proceso, se introduce oxígeno en un horno de tratamiento térmico para formar una película de óxido de silicio sobre la superficie.

(3) El grabado de pocillos se puede llevar a cabo, por ejemplo, con solución de grabado alcalina (tal como, TMAH: hidróxido de tetrametilamonio). En este momento, la superficie de silicio en la que no se ha difundido el boro se graba fácilmente, mientras que la superficie de silicio en la que se ha difundido el boro a concentración alta tiende a no grabarse. Por tanto, el grabado se puede continuar selectivamente en las partes del patrón de pocillos en las que se ha difundido el boro. Cuando el grabado se realiza en la dirección del grosor del sustrato, el grabado continúa a los lados directamente bajo la película fina. Cuando el grabado se lleva a cabo más allá del tiempo prescrito, se forman protuberancias en forma de alero en las entradas a los micropocillos formados sobre el sustrato de silicio.

(4) Esto proporciona un chip de matriz de micropocillos del aspecto II.

El chip de matriz de micropocillos del aspecto II también puede tener regiones hidrófobas provistas de manera que rodeen los múltiples micropocillos sobre la superficie principal que tiene múltiples micropocillos. Los detalles específicos de estas regiones son como se describe para el aspecto I anterior.

[Aspecto III]

El aspecto III de la presente invención se describe a continuación.

El chip de matriz de micropocillos

El chip de matriz de micropocillos del aspecto III, la presente invención, es un chip de matriz de micropocillos fabricado de silicio y que tiene múltiples micropocillos, usándose cada micropocillo para almacenar una célula orgánica de muestra individual, en el que cada micropocillo es de un tamaño y forma que puede mantener sólo una célula orgánica.

La célula orgánica de muestra anterior puede ser un linfocito, por ejemplo. El chip de matriz de micropocillos de la presente invención se puede usar para detectar linfocitos específicos de antígeno individuales.

Ni el tamaño ni la forma de los micropocillos están limitados específicamente. Sin embargo, por ejemplo, la forma del micropocillo puede ser cilíndrica. También puede ser no cilíndrica, tal como un poliedro compuesto de múltiples caras (por ejemplo, un paralelepípedo, columna hexagonal o columna octagonal), un cono invertido, una pirámide invertida (pirámide triangular invertida, pirámide cuadrada invertida, pirámide pentagonal invertida, pirámide hexagonal invertida, o una pirámide poligonal invertida con siete o más ángulos), o tener una forma que combine dos o más de estas formas. Por ejemplo, puede ser parcialmente cilíndrica, tendiendo la parte restante la forma de un cono invertido. En el caso de una forma cónica invertida o piramidal invertida, la boca del micropocillo está en el fondo. Sin embargo, la forma puede ser una en la que una parte de la parte superior de un cono invertido o pirámide invertida esté cortada (caso en el que el fondo del micropocillo es plano). Para formas cónicas y paralelepípedas, el fondo del micropocillo normalmente es plano, pero también son posibles superficies curvadas (convexas o cóncavas). El motivo por el que se fabrica curvado el fondo del micropocillo es el mismo que para formas que consisten en un cono invertido o una pirámide invertida con una parte de la parte superior cortada.

La forma y el tamaño del micropocillo se determinan de forma adecuada en consideración al tipo de célula orgánica (forma, tamaño y similares de la célula orgánica) que se va a almacenar en el micropocillo de modo que estará contenida una célula orgánica individual por micropocillo.

Para garantizar que estará contenida una célula orgánica individual por micropocillo, por ejemplo, el diámetro del círculo más grande que se puede inscribir en la forma plana del micropocillo entra de forma adecuada dentro del intervalo de 0,5 a 2 veces, de forma deseable de 0,8 a 1,9 veces, y preferentemente, de 0,8 a 1,8 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en el micropocillo.

Además, la profundidad del micropocillo entra de forma adecuada dentro de un intervalo de 0,5 a 4 veces, de forma deseable de 0,8 a 1,9 veces, y preferentemente, de 0,8 a 1,8 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en el micropocillo.

5 Para un micropocillo con forma cilíndrica, las dimensiones pueden ser, por ejemplo, un diámetro de 3 a 100 micrómetros. Cuando la célula orgánica es un linfocito B, el diámetro es de forma deseable de 4 a 15 micrómetros. Además, la profundidad puede ser de 3 a 100 micrómetros, y en el caso de que la célula orgánica sea un linfocito B, la profundidad es de forma deseable de 4 a 40 micrómetros. Sin embargo, las dimensiones del micropocillo, como se
10 expone anteriormente, se pueden determinar de forma adecuada en consideración a una proporción deseada del diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en el micropocillo con relación a las dimensiones del micropocillo.

15 El número de micropocillos presentes en un chip de matriz de micropocillos individual no está limitado específicamente. Sin embargo, cuando la célula orgánica es un linfocito y la frecuencia de un linfocito específico de antígeno dado por 10^5 células es de 1 a aproximadamente 500 en el extremo superior, el número de micropocillos puede variar de aproximadamente 2.000 a 1.000.000 por cm^2 , por ejemplo.

20 Como en los aspectos I y II, la forma de la superficie de la pared interna del micropocillo en el aspecto III es de forma deseable lisa para permitir la retirada homogénea de células. Los detalles específicos son como se describe para el aspecto I.

25 El chip de matriz de micropocillos del aspecto III de la presente invención se fabrica de silicio. El uso de silicio permite la aplicación como tal de las técnicas de procesamiento de silicio que son la corriente principal de las técnicas de fabricación de circuitos integrados semiconductores actuales. En particular, el silicio es mejor que otros materiales en términos de sus propiedades de microfabricación, propiedades de producción en masa, e integración futura con circuitos de análisis, incluyendo sensores.

30 Ya que el chip de matriz de micropocillos del aspecto III se fabrica de silicio, el hecho de que una película de óxido de silicio cubra la superficie de sustrato es deseable desde las perspectivas de la propiedad hidrófila de la superficie del chip, la estabilidad de la película, y las propiedades de producción en masa. Una superficie de silicio normalmente es hidrófoba, teniendo la propiedad de repeler la solución de suspensión celular durante la siembra de la solución de suspensión celular y a veces impedir el almacenamiento de células orgánicas en los micropocillos. En consecuencia, una película de óxido de silicio es deseable desde las perspectivas de tener una mayor propiedad
35 hidrófila que el silicio y proporcionar estabilidad de película.

40 En el chip de matriz de micropocillos del aspecto III, la superficie interna de los micropocillos se cubre de forma deseable con una película de fluorocarbono o película de óxido de silicio. La formación de una superficie exclusiva, inerte, tal como una película de fluorocarbono o película de óxido de silicio sobre la superficie interna de los micropocillos es deseable ya que evita la adhesión de la célula orgánica y facilita la recuperación de la célula orgánica del micropocillo.

45 Esto es, cuando se manejan células orgánicas en micropocillos, la adhesión de las células orgánicas al interior de los micropocillos es un problema. En particular, la adhesión de células orgánicas cuando se intenta recuperar células orgánicas dentro de los micropocillos desde los micropocillos es un problema considerable. Para resolver este problema, en la presente invención, una película tal como una película de fluorocarbono o película de óxido de silicio se forma de forma deseable en los pocillos que están en contacto con células orgánicas.

50 Las películas de fluorocarbono son películas hidrófugas. Una película hidrófuga se forma de forma deseable sólo dentro de los pocillos; la formación de una película de óxido de silicio (película de óxido de silicio) tal como se expone anteriormente es deseable en superficies distintas de los pocillos del chip de matriz de micropocillos. Además, aunque las películas de óxido de silicio no presenten una propiedad hidrófuga tal como la de las películas de fluorocarbono, tienen un efecto en la prevención de la adhesión de células orgánicas. En particular, las películas de óxido de silicio formadas por oxidación a alta temperatura con oxígeno seco son densas. Aunque no tienen una
55 repelencia al agua hasta el grado de repeler el agua como las películas de fluorocarbono, tienen una propiedad que está entre una propiedad hidrófila y una hidrófoba. Ya que las células orgánicas se manejan normalmente por dispersión en solución, cuando el chip de matriz de micropocillos como un todo tiene una superficie hidrófoba o hidrófuga, tiende a ser difícil almacenar células orgánicas en los pocillos. Por tanto, en la presente invención, las superficies distintas de las superficies de pocillos se recubren de forma deseable con películas de óxido de silicio, y
60 las películas de fluorocarbono o películas de óxido de silicio se forman de forma selectivamente deseable justo en los pocillos.

65 Cuando se forma una película de fluorocarbono por los métodos de procesamiento de superficie normales, la película se forma después de que se haya fabricado el pocillo. Por tanto, todo el sustrato se termina cubriendo por la película de fluorocarbono, volviéndose una superficie hidrófuga. En consecuencia, el siguiente método se emplea en la presente invención. Este método se describirá para el ejemplo de un chip de matriz de micropocillos que emplea

un sustrato de silicio.

Un patrón de micropocillo se forma por fotolitografía sobre un sustrato de silicio. La temperatura de endurecimiento de la capa fotoprotectora no es mayor de 100 °C. A continuación, se emplea un dispositivo de vacío de grabado seco para formar los micropocillos. Una vez se ha confirmado la fabricación de los micropocillos, se introduce un gas a base de CF en el dispositivo a vacío y se lleva a cabo un CVD de plasma. El CVD de plasma se puede llevar a cabo usando el dispositivo de grabado como tal, o en el dispositivo de CVD de un cuerpo separado del equipo. Después de formar la película durante varios minutos, el sustrato se retira desde el dispositivo de vacío y se sumerge en un disolvente orgánico tal como metanol o acetona. Esto levanta tanto la máscara del patrón de micropocillo como la película de fluorocarbono sobre ella, dejando una película de fluorocarbono sólo sobre la pared interna del micropocillo. Las etapas de grabado y formación de película se pueden llevar a cabo en el mismo dispositivo cambiando simplemente el tipo de gas empleado.

En lugar de una película de fluorocarbono, la superficie interna de los pocillos se puede cubrir con una película de óxido de silicio, como se expone anteriormente. Se puede lograr un efecto mejorado sobre la tasa de recuperación de células orgánicas de los pocillos incluso cuando la superficie interna de los pocillos está cubierta con una película de óxido de silicio en lugar de una película de fluorocarbono.

El método de recubrir la superficie interna de los pocillos con una película de óxido de silicio se describirá a continuación.

En este caso, se forma un patrón de pocillo, la capa fotoprotectora se retira, y se forma una película de óxido en caliente o similar para obtener un chip de matriz de micropocillos en el que la superficie interna de los pocillos está recubierta con una película de óxido de silicio.

También es posible obtener un chip de matriz de micropocillos en el que se evite la adhesión de células orgánicas a la superficie interna de los pocillos por la formación de silicio poroso dentro de los pocillos en lugar de una película de fluorocarbono o película de óxido de silicio. Se puede producir silicio poroso por un método tal como anodización de la superficie interna de los pocillos.

Además de las películas de fluorocarbono, películas de óxido de silicio, y silicio poroso, se puede tratar el chip de matriz de micropocillos de la presente invención, o se puede formar una película, para inhibir superficies de silicio activas.

En el chip de matriz de micropocillos del aspecto III, se pueden proporcionar regiones hidrófobas de manera que rodeen a múltiples micropocillos sobre una superficie que tiene múltiples micropocillos. Los detalles específicos de estas regiones hidrófobas son como se expone anteriormente en el aspecto I. Además, en el chip de matriz de micropocillos del aspecto III como se expone anteriormente, dichas regiones también se pueden recubrir con una película de fluorocarbono para formar regiones hidrófobas en el transcurso del recubrimiento de la superficie interna de los micropocillos con una película de fluorocarbono.

Realizaciones

Realización 1

(Marcador fluorescente)

La figura 1 es un ejemplo de un aspecto de implementación del dispositivo del aspecto I de la presente solicitud.

La figura 1 muestra un chip de matriz de micropocillos en el que se han formado múltiples micropocillos 1b sobre una superficie de sustrato 1a de material de silicio. Los micropocillos 1b forman grupos 1c de números adecuados de unidades (por ejemplo, $10 \times 10 = 100$) para facilitar la identificación de la posición. Un uso del presente chip de matriz de micropocillos es la introducción de una célula a la que se ha añadido una sustancia fluorescente en cada pocillo para su evaluación, y la determinación de emisión fluorescente. En este proceso, las células que no fluorescencia no se pueden observar porque la observación por microscopio de fluorescencia o escáner de fluorescencia se lleva a cabo con especificaciones basadas en la longitud de onda de fluorescencia. En consecuencia, como se muestra en la figura 1, se forma un marcador 1d diminuto de una sustancia fluorescente entre los grupos individuales.

El método de fabricación de estos marcadores se da a continuación (figura 2).

Se describirán dos métodos de fabricación de micropocillos en los que se forman marcadores sobre un sustrato de un material de silicio o similar.

Método de fabricación del marcador (I)

(1) La capa fotoprotectora positiva a base de resina de Novolak OFPR-800 fabricada por Tokyo Ohka Kogyo (K.K.), por ejemplo, se recubre sobre un sustrato de silicio 2b (figura 2(I)(A)) que tiene una película de óxido de silicio 2a, y un patrón de marcador 2c se forma sobre el sustrato (figura 2(I)(B)).

5 (2) El sustrato se endurece durante 30 minutos a 180 °C y se procesa de otro modo para potenciar la resistencia química de la capa fotoprotectora por reticulación térmica y similares.

10 (3) La capa fotoprotectora 2d se aplica de nuevo para formar un patrón de abertura 2e requerido para fabricar micropocillos sobre el sustrato de silicio 2b (Figs. 2(I)(C) y (D)). En este momento, se lleva a cabo el endurecimiento seguido del desarrollo a una temperatura baja de desde aproximadamente 100 a 110 °C.

(4) El ácido fluorhídrico se usa para retirar la película de óxido de silicio 2a en partes de abertura, exponiendo el silicio.

15 (5) A continuación, se emplea el grabado seco para grabar el sustrato de silicio 2b, produciendo micropocillos 2f (figura 2(I)(E)).

(6) La capa fotoprotectora 2d aplicada en (3) se retira con metanol, acetona, o similares, proporcionando un chip de matriz de micropocillos del aspecto I (figura 2(I)(F)).

20 Método de fabricación del marcador (II)

25 (1) La capa fotoprotectora positiva a base de resina de Novolak OFPR-800 fabricada por Tokyo Ohka Kogyo (K.K.), por ejemplo, se recubre sobre un sustrato de silicio 2b (figura 2(II)(A)) que tiene una película de óxido de silicio 2a, y un patrón de marcador 2c se forma sobre el sustrato (figura 2(II)(B)).

(2) El sustrato se temple durante 30 minutos a 180 °C y se procesa de otro modo para potenciar la resistencia química de la capa fotoprotectora por reticulación térmica y similares.

30 (3) La capa fotoprotectora 2d se aplica de nuevo para formar un patrón de abertura 2e requerido para fabricar micropocillos sobre el sustrato de silicio 2b (Figs. 2(II)(C) y (D)). En este momento, se lleva a cabo el tratamiento térmico seguido del desarrollo a una temperatura baja de desde aproximadamente 100 a 110 °C.

35 (4) El ácido fluorhídrico se usa para retirar la película de óxido de silicio 2a en partes de abertura, exponiendo el silicio (figura 2(II)(E)).

(5) A continuación, se retira la capa fotoprotectora que forma el patrón de pocillo con un disolvente orgánico tal como acetona.

40 (6) Usando la película de óxido de silicio 2a sobre el sustrato de silicio 2b como una máscara, se usa un método tal como grabado seco para grabar el sustrato de silicio 2b y formar micropocillos 2f, proporcionando de este modo un chip de matriz de micropocillos del aspecto I (figura 2(II)(F)).

45 En base al método de fabricación del marcador (II), en el transcurso de la retirada de la capa fotoprotectora después de la formación del pocillo, la capa fotoprotectora no se desnaturaliza y se hace difícil su retirada en la etapa de grabado seco. Además, la superficie de sustrato de silicio que se forma proporciona una superficie ultrahidrófila debido al efecto de plasma.

50 Las etapas anteriores producen fácilmente una forma tal como la que se muestra en la figura 2. El patrón del marcador 2c se puede seleccionar libremente de entre diseños, códigos, caracteres, y similares. También es posible presentar información distinta de los marcadores sobre el microchip.

Realización 2

55 (Marcador reflectante)

60 La figura 3 es un aspecto de implementación de un marcador reflectante 3d que se puede observar observando luz dispersada con un microscopio de fluorescencia o escáner de fluorescencia formando depresiones y elevaciones sobre el sustrato de silicio 3a. Se usa como marcador para identificar las posiciones de grupos de múltiples micropocillos 3b dispuestos sobre el sustrato de silicio 3a. Formando una hendidura 3e por grabado o similares sobre el sustrato y dirigiendo un haz de excitación de fluorescencia hacia un dispositivo de observación por medio de reflexión irregular, es posible identificar la posición de la hendidura.

65 La figura 4 muestra el principio implicado. Para la superficie de un sustrato 4a sin nada, tal como las depresiones o elevaciones mostradas en el lado izquierdo de la figura, no entra luz de excitación al dispositivo de observación debido a la total reflexión. Sin embargo, cuando las hendiduras en el lado derecho dispersan el haz de excitación de

forma radial, la luz reflejada entra en el sistema óptico del dispositivo de observación y se puede identificar.

Desde la perspectiva de dispersión radial de un haz de excitación, el fondo de la hendidura 4b es de forma deseable una pirámide invertida.

5 Un ejemplo de fabricación de un chip de matriz de micropocillos con marcadores de reflexión se describirá para el caso de un sustrato de silicio basado en las figuras 5 y 6.

10 (1) La capa fotoprotectora positiva a base de resina de Novolak OFPR-800 (5c) fabricada por Tokyo Ohka Kogyo (K.K.), por ejemplo, se recubre sobre un sustrato de silicio 5b (figura 5(A)) que tiene una película de óxido de silicio 5a, y un patrón de marcador 5d se forma sobre el sustrato (figura 5(B)).

15 (2) El ácido fluorhídrico se usa para retirar la película de óxido de silicio 5a que tiene aberturas de la capa fotoprotectora 5c, exponiendo el silicio (figura 5(C)).

(3) La capa fotoprotectora 5c se retira, el sustrato de silicio 5b se sumerge en un agente de grabado alcalino como hidróxido de tetrametilamonio o hidróxido de potasio para llevar a cabo el grabado anisótropo, formando la estructura de hendiduras 5e (figura 5(D)). En este punto, se completan los marcadores de la presente invención. Posteriormente, se fabrica la estructura de matriz de micropocillos.

20 (4) Según sea necesario, se puede volver a formar una máscara de capa fina de película de óxido de silicio o película de nitruro de silicio sobre la superficie de sustrato 5b (figura 6(A)).

25 (5) La capa fotoprotectora 5f se aplica de nuevo (figura 6(B)) para formar un patrón de micropocillo 5g y la película de óxido de silicio o la película de óxido nitruro de las partes huecas se retira con un agente de grabado, exponiendo el silicio (figura 6(C)).

30 (6) Según sea necesario, la capa fotoprotectora 5f se retira y se emplea el grabado seco o húmedo para formar el micropocillo 5h (figura 6(D)).

(7) Según sea necesario, la capa fotoprotectora 5f se retira para obtener un chip de matriz de micropocillos del aspecto I (figura 6(E)).

35 *Realización 3 (Una realización con estructura de reborde)*

La figura 7 muestra una estructura de micropocillos fabricada en base al aspecto II de la presente solicitud.

40 La presente estructura se puede lograr seleccionando una película fina superior de un material que es fácil de procesar con un sustrato semiconductor, sustrato de resina, o similares. Los micropocillos 13 que se forman sobre la superficie del sustrato de silicio 11 de superficie (100) miden de varios micrómetros a varias decenas de micrómetros tanto en diámetro de abertura como en profundidad. La superficie sobre la que no se forman pocillos se cubre con una capa de película fina 12' en forma de una película de óxido, película de metal, o similares. El sustrato se graba para formar aberturas de pocillos 13a, en las que se encuentran protuberancias con forma de alero 14 de la capa de película fina 12'. El grosor de la capa de película fina 12' se controla desde varios cientos de nanómetros a varios micrómetros durante la formación. Las protuberancias con forma de alero 14 formadas de la capa de película fina 12' se logran por un método de grabado en el que la capa de película fina 12' se graba un poco durante la formación por grabado de los micropocillos 13, y el grabado del sustrato se lleva a cabo al fondo de la capa de película fina 12'.

50 En la presente realización, las etapas de fabricación en la figura 9 se describirán usando silicio, un sustrato semiconductor típico, como ejemplo.

(1) Un sustrato de silicio 11 (100) 11 se oxida en caliente para formar una capa película fina 12 de aproximadamente varios micrómetros sobre la superficie (figura 9(A)).

55 (2) Se emplea una etapa de fotolitografía para transferir el patrón de pocillo 15 al sustrato de silicio 11, exponiendo el silicio sólo en las partes de pocillo (figura 9(B)).

60 (3) El silicio se graba por inmersión durante varias decenas de minutos en solución acuosa de hidróxido de tetrametilamonio (90 °C, 25 por ciento). El tiempo de grabado se determina en base a la profundidad *d* del pocillo deseado y al tamaño *w* del alero (figura 8(B)).

(4) Después de que transcurra el tiempo de grabado especificado, el sustrato de silicio se retira de la solución de grabado.

65 La estructura de la figura 9(C) se puede formar por las etapas anteriores. La solución acuosa de hidróxido de tetrametilamonio empleada aquí permite una estructura hueca bajo la película de óxido debido a que la película de

óxido se graba lentamente y el grabado progresa en la dirección lateral de los pocillos.

El chip de matriz de micropocillos del aspecto II también puede tener las estructuras mostradas en las figuras 9(D) y (E). Un chip de matriz que tiene micropocillos de las estructuras mostradas en las figuras 9(D) y (E) se puede formar variando el método anterior como sigue.

Por ejemplo, cuando se selecciona un sustrato de silicio, se puede lograr la estructura de la figura 9(D) por grabado seco RIE y se selecciona de forma adecuada una orientación de superficie de sustrato y un patrón de pocillo. Por ejemplo, la cara (100), (110), o (111) se selecciona como la orientación de cara de sustrato y se puede seleccionar una forma de patrón que provocará que una cara de grabado aparezca perpendicular a la superficie de sustrato. La estructura de la figura 9(E) se puede lograr por un método de grabado con características de grabado isótropas. Por ejemplo, en el grabado seco común y en el grabado con una solución mezclada de ácido fluorhídrico y ácido nítrico, el silicio se graba de forma isótropa, proporcionando fácilmente la estructura del aspecto II de la presente invención.

La capa de película fina no está limitada a una película de óxido. También es posible un cambio a resinas, películas finas de metal, silicio germanio, germanio, silicio difundido de alta concentración de impurezas, y similares. Se puede emplear grabado húmedo o bien grabado seco. Puesto que el grabado húmedo permite el procesamiento de sustratos en lotes, proporciona una buena eficiencia en la producción en masa.

Se realizó una evaluación de las tasas de matriz en chips de matriz de micropocillos (tasas de llenado) cuando se variaron las distintas dimensiones (mostradas en la figura 10) de chips de matriz de micropocillos obtenidos por el método descrito anteriormente como se indica en la tabla 1. Los resultados se dan en la tabla 1. La concentración de las células sembradas fue de 10^5 células/microlitro. Método de evaluación de la tasa de matrices de células (tasa de llenado)

1. Se recogieron linfocitos de ratones. La concentración de las células obtenida fue de 10^4 a 10^5 células/microlitro. Se colocaron las células en una solución salina equilibrada de Hank (HBSS) para su almacenamiento.

2. Se tiñó de forma fluorescente cada una de las células. Se tiñó cada célula con CellTracker Orange, que emitió fluorescencia a la longitud de onda de excitación (532 nm) del escáner de fluorescencia empleado en la medida.

3. Se sembraron las células teñidas sobre un chip de silicio con una micropipeta. Se repitió la siembra tres veces y finalmente se retiraron por lavado las células que no habían entrado en los pocillos.

4. Se cubrió el chip con un portaobjetos de vidrio para evitar el secado, y se leyó la intensidad fluorescente con un escáner de micromatriz.

5. Se seleccionó un total de 4.500 pocillos sobre el chip y se contó el número de pocillos que emitieron fluorescencia. Se calculó la tasa de matriz (tasa de llenado) por la siguiente ecuación.

Tasa de matriz (tasa de llenado) = (número de pocillos que emitieron fluorescencia / 4.500) x 100

Tabla 1

Relación entre las dimensiones del pocillo y alero de la muestra y la tasa de matriz (llenado)

	d	p	2r	W1	W2	Tasa de matriz (llenado)
Muestra A	9,2 micrómetros	13,0 micrómetros	12 micrómetros	0,5 micrómetros	2,7 micrómetros	aprox. un 73 por ciento
Muestra B	11,8 micrómetros	16,7 micrómetros	13,9 micrómetros	1,4 micrómetros	5,0 micrómetros	aprox. un 24,9 por ciento

Para las muestras A y B, se examinaron los cambios en la tasa de matriz (llenado) en base a diferencias en las dimensiones de pocillo y alero. Como resultado, se descubrió que cuando el diámetro celular era de 8 micrómetros, la tasa de matriz (llenado) de la muestra B era peor que el de la muestra A. Esto se atribuyó a un diámetro 2r de abertura excesivamente grande de la muestra B.

La tasa de matriz (llenado) se incrementó con la profundidad del pocillo, pero con una abertura grande tal como la de la muestra B, la tasa de matriz (llenado) tendió a disminuir. En consecuencia, el diseño del pocillo debe tener en cuenta de forma adecuada la profundidad, el diámetro de abertura, y la dimensión del alero del pocillo.

Realización 4

(Una realización de formación de película de fluorocarbono)

La figura 11 es un dibujo esquemático descriptivo de un chip de matriz de micropocillos con relación al aspecto III, la

presente invención.

Sobre la superficie del sustrato de silicio 21a están dispuestos múltiples patrones de micropocillo 21b. El tamaño de cada micropocillo 21b es de varios micrómetros a varias decenas de micrómetros. Se formó una película de fluorocarbono 21c con un gas a base de CxFy sobre la pared lateral de cada pocillo formado, y un efecto de reducción de energía de superficie creó un estado inerte. La película de fluorocarbono 21c, que presentó una propiedad hidrófoba, se formó de forma selectiva dentro de los micropocillos, pero no estuvo presente sobre la superficie más externa 21d del silicio. La célula orgánica que entra en el micropocillo 21b tendía a no adherirse fácilmente. El efecto de proporcionar una película de fluorocarbono dentro de los micropocillos era particularmente marcado cuando el micropocillo era profundo.

La figura 12 muestra las etapas de fabricación de un chip de matriz de micropocillos que emplea un sustrato de silicio.

(1) La capa fotoprotectora positiva a base de resina de Novolak OFPR-800 (22c) fabricada por Tokyo Ohka Kogyo (K.K.), por ejemplo, se recubre sobre un sustrato de silicio 22b que tiene una película de óxido de silicio 22a, y se forma un patrón de micropocillo 22d. En este momento, se lleva a cabo el tratamiento térmico seguido del desarrollo a una temperatura menor (desde aproximadamente 100 a 110 °C) que la usual.

(2) El sustrato de silicio 22b se graba introduciendo un gas de grabado de silicio tal como SF6 en un dispositivo de grabado seco de plasma para formar micropocillos 22e.

(3) Se introduce un gas a base de CxFy en el mismo dispositivo de grabado para llevar a cabo la formación de película de plasma. En este punto, se forma una película de fluorocarbono 22f dentro de los pocillos y sobre la superficie de sustrato de silicio. Esta etapa también se puede llevar a cabo transfiriendo el sustrato a un dispositivo CVD de plasma y llevando a cabo el mismo procesamiento.

(4) El sustrato retirado del dispositivo se sumerge en un disolvente orgánico tal como metanol o acetona para retirar la capa fotoprotectora. En este punto, también se levanta la película de fluorocarbono formada sobre la capa protectora.

(5) Se obtiene un chip de matriz de micropocillos en el que la superficie más externa del sustrato de silicio se recubre con una película de óxido de silicio 22a y el interior de los pocillos se recubre con una película de fluorocarbono inerte 22f.

Se evaluó la tasa de matriz (llenado) de un chip de matriz de micropocillos obtenido por el método descrito anteriormente por el mismo método que en la realización 3. Se evaluó la tasa de recogida por el siguiente método. Los resultados se dan en la tabla 2. La tabla 2 proporciona los resultados de evaluación para un chip de matriz de micropocillos en el que se formó una película de fluorocarbono dentro de los pocillos. Para todas las muestras, se seleccionaron el mismo diámetro y profundidad de pocillo. La concentración de las células sembradas fue de 10^5 células/microlitro.

Método de evaluación de la tasa de recogida

1. En base al método de evaluación de tasa de matriz celular descrito anteriormente, se sembraron células en una matriz de micropocillos.

2. Se seleccionó un número aleatorio de pocillos (aproximadamente de 10 a 30) y se retiraron las células de los pocillos con un micromanipulador. En ese momento, la retirada no se llevó a cabo de forma agresiva; se procedió con cuidado para emplear las mismas condiciones de retirada para cada pocillo.

3. Para el número de pocillos seleccionado aleatoriamente, la proporción del número de pocillos a partir de los que se retiraron con éxito células se indicó como la tasa de recogida.

Tasa de recogida = (número de pocillos a partir de los que se retiraron con éxito células)/número de pocillos seleccionados aleatoriamente) x 100

Tabla 2

Muestra	A	B	C	D	E	F
Tasa de matriz (llenado)	99,4 %	99,2 %	99,2 %	99,4 %	99,3 %	98,9 %
Tasa de recogida	0 %	10 %	6,7 %	50 %	30 %	89,3 %

Especificaciones de muestra: Diámetro de pocillo: 11 micrómetros, profundidad 30 micrómetros

Muestras A-C: Sin recubrimiento, tiempo de grabado: 8 minutos

Muestras D-F: Recubrimiento presente, tiempo de grabado: 8 minutos + tiempo de recubrimiento: 1 minuto

5 Realización 5

Fabricación de un chip de matriz de micropocillos que tiene una película de óxido (óxido de silicio) en los pocillos (véase la figura 13)

10 (1) La capa fotoprotectora positiva a base de resina de Novolak OFPR-800 fabricada por Tokyo Ohka Kogyo (K.K.), por ejemplo, se recubre sobre un sustrato de silicio 23b que tiene una película de óxido de silicio 23a, y se forma un patrón de micropocillo 23d.

15 (2) Se introdujo un gas de grabado de silicio tal como SF₆ en un dispositivo de grabado seco de plasma para grabar sustrato de silicio 23b y formar micropocillos 23e.

(3) La capa fotoprotectora sobre el sustrato que se había retirado del dispositivo se retira con una solución de separación de capa protectora tal como una solución mezclada de ácido sulfúrico y agua con peróxido de hidrógeno.

20 (4) El sustrato se lava con amoníaco (amoníaco + agua con peróxido de hidrógeno + agua) con un lavado de RCA y se lava con ácido clorhídrico (ácido clorhídrico + agua con peróxido de hidrógeno + agua).

(5) El sustrato se introduce en un horno de tratamiento térmico en una atmósfera de oxígeno seco y se trata con óxido en caliente durante 30 minutos a 1.100 °C.

25 (6) Después de que desciende la temperatura, el sustrato se retira del horno de tratamiento térmico.

(7) Esto proporciona un chip de matriz de micropocillos con una película de óxido 23f formada sobre la superficie de sustrato de silicio y en los pocillos y una película de óxido (óxido de silicio) formada en los pocillos.

30 Se evaluaron la tasa de matriz (llenado) y la tasa de recogida del chip de matriz de micropocillos obtenido por el método descrito anteriormente por los mismos métodos que se han expuesto anteriormente. Los resultados se dan en la tabla 3. Para todas las muestras, se seleccionaron el mismo diámetro y profundidad de pocillo. La concentración de células sembradas fue de 10⁵ células/microlitro.

35 Tabla 3

Muestra	A	B	C	D	E	F
Tasa de matriz (llenado)	99,4 %	99,2 %	99,2 %	91,6 %	98,4 %	98,5 %
Tasa de recogida	0 %	10 %	6,7 %	45 %	30 %	55,6 %

Especificaciones de muestra: Diámetro de pocillo: 11 micrómetros, profundidad 30 micrómetros

40 Muestras A-C: Sin película de óxido, tiempo de grabado: 8 minutos

Muestras D-F: Película de óxido presente. Tiempo de grabado: 8 minutos, temperatura de oxidación:

45 1,100 °C, atmósfera de oxidación: Oxígeno seco, tiempo de oxidación: 30 minutos

Grosor de la película de oxidación: 63 nm (sobre la cara de cristal de silicio (100))

Realización 6

50 (Tratamiento de alisado)

En la fabricación de la realización 4, se trataron las paredes internas del chip de matriz de micropocillos para que fueran lisas antes de la formación de la película de fluorocarbono. El tratamiento de alisado se llevó a cabo usando un dispositivo de grabado Multiplex ASE fabricado por STS Corporation y ajustando los tiempos de ciclo de proceso de la etapa de grabado y la etapa de formación de película protectora. De esta manera, se fabricaron dos tipos de chips de matriz de micropocillos: uno que tiene depresiones y elevaciones de 0,5 micrómetros en altura sobre las paredes internas, y el otro que tiene depresiones y elevaciones de 0,1 micrómetros en altura sobre las paredes internas. La figura 17 es una fotografía ampliada de micropocillos que tienen depresiones y elevaciones 0,1 micrómetros en altura sobre las paredes internas.

60 Se evaluó la tasa de recogida del chip de matriz de micropocillos obtenido por el método descrito anteriormente por

el mismo método que antes. Los resultados se dan en la tabla 4. La concentración de células sembradas fue de 10^5 células/microlitro. Inmediatamente después de la siembra, no se produjo una gran diferencia en las tasas de recogidas de los dos chips. Sin embargo, cuando hubo transcurrido una hora después de la siembra, la tasa de recogida del chip provisto de depresiones y elevaciones de 0,5 micrómetros en altura por un tratamiento de alisado descendió a un 0 por ciento, mientras que el chip provisto de depresiones y elevaciones de 0,1 micrómetro en altura por un tratamiento de alisado mantuvo más o menos la tasa de recogida que tenía inmediatamente después de la siembra. Esto indicó que cuando más pequeña es la altura de las depresiones y elevaciones en las paredes internas, mayor es la prevención de adhesión de las células a los pocillos con el paso del tiempo. Además, se pensó que el alisado de las paredes internas permitió que el recubrimiento de la realización 4 funcionara eficazmente.

Tabla 4

	Altura de depresiones y elevaciones de 0,5 micrómetros	Altura de depresiones y elevaciones de 0,1 micrómetros
Tasa de recogida inmediatamente posterior a la siembra	80 %	100 %
Tasa de recogida una hora después de la siembra	0 %	90 %

Realización 7

(Formación de protuberancias en las aberturas)

En la fabricación de la realización 4, se formaron protuberancias de 0,6 micrómetros en altura en las aberturas de los micropocillos. Usando un dispositivo de grabado Multiplex ASE fabricado por STS Corporation, el tiempo de ciclo de proceso del dispositivo se extendió durante el grabado inicial para formar protuberancias de la altura deseada. Después de la formación de protuberancias, se ajustó el tiempo de ciclo de proceso para fabricar micropocillos que tengan protuberancias sólo en las aberturas. La figura 18 es una fotografía ampliada de micropocillos en los que se han formado protuberancias en las aberturas.

Después de la fabricación de los micropocillos, es posible formar una película de fluorocarbono en las paredes internas. Las protuberancias se pueden formar en cualquier posición. El tiempo de ciclo de proceso se puede ajustar a una posición en la que se desee la formación de una protuberancia para fabricar una protuberancia en el medio del pocillo, sobre el fondo del pocillo o en cualquier otro sitio. La selección adecuada de la forma y del número de protuberancias se puede anticipar para proporcionar una variedad de efectos.

Aplicabilidad industrial

En el chip de matriz de micropocillos del aspecto I de la presente solicitud, los marcadores en forma de una sustancia fluorescente, estructuras reflectantes, o similares están presentes en localizaciones seleccionadas como objetivo. Estos marcadores realizan la función de identificar posiciones, facilitando de este modo la identificación de posiciones por un microscopio de fluorescencia. En el chip de matriz de micropocillos del aspecto I, las posiciones de los micropocillos se pueden determinar fácilmente por un microscopio de fluorescencia, escáner de imágenes, o similares. Como resultado, se puede especificar fácilmente una muestra específica individual de una célula orgánica almacenada en un micropocillo individual (por ejemplo, un linfocito específico de antígeno). Como resultado, es posible retirar un linfocito específico de antígeno que se ha detectado y clonar el gen del anticuerpo específico de antígeno o gen del receptor de linfocito T. Por ejemplo, una vez que es posible clonar un gen de anticuerpo específico de antígeno, se puede usar para producir grandes cantidades de anticuerpo monoclonal humano. Se cree que administrando este anticuerpo a un paciente humano con una enfermedad infecciosa, es posible tratar y evitar la enfermedad infecciosa. Además, usando el chip de matriz de micropocillos del aspecto I, también es posible distinguir células de la sangre. Esto es, ajustando los micropocillos a un diámetro prescrito, es posible separar células de la sangre en las que exceden y las que entran dentro del diámetro del micropocillo.

En base al aspecto II de la presente solicitud, ya que una célula que ha entrado en un pocillo se queda atrapada sobre la protuberancia (alero) en la parte superior del pocillo, se puede retener en el pocillo con una alta probabilidad y no fluye al exterior del pocillo durante el lavado. Por ejemplo, cuando el pocillo tiene una estructura de pirámide invertida, la formación de un reborde cambia la distribución de fluido sobre la superficie del chip y dentro del pocillo. Por tanto, se puede evitar que una célula que ya ha entrado fluya fuera del líquido durante el lavado. Aún más, incluso cuando una célula que ha entrado en un pocillo comienza a moverse hacia el exterior del pocillo, se queda atrapada sobre el alero y tiende a permanecer dentro del pocillo.

Además, cuando se retira una célula que ha entrado en un pocillo, el cuidadoso diseño de la del pocillo puede evitar la generación de un vacío entre la célula y la superficie de la célula durante la succión. Esto es, cuando al pocillo se le imparte la forma de una pirámide invertida, las crestas hacen la función de liberar presión de modo que durante la aspiración de la célula, no se forma vacío entre el pocillo y la célula, lo que permite la fácil recogida de la célula.

- En el chip de matriz de micropocillos del aspecto III, la presente invención, cada micropocillo puede contener sólo una célula orgánica de muestra, tal como un linfocito. Por tanto, por ejemplo, es posible especificar linfocitos específicos de antígeno al nivel de célula individual. Eso es, usando el chip de matriz de micropocillos del aspecto III
- 5 en la detección de linfocitos específicos de antígeno, ya que sólo un linfocito de muestra está contenido en un micropocillo dado, es posible especificar una célula individual en forma de un linfocito de muestra que reacciona con el antígeno.
- 10 Como resultado, por ejemplo, se puede retirar un linfocito específico de antígeno que se ha detectado y se puede clonar el gen de anticuerpo específico de antígeno o el del receptor de linfocito T. Por ejemplo, una vez que es posible clonar el gen de anticuerpo específico de antígeno, se puede usar para producir grandes cantidades de anticuerpo monoclonal humano. Se cree que este anticuerpo se puede administrar a continuación a pacientes con una enfermedad infecciosa o similar para tratar y evitar la enfermedad infecciosa o similar.

REIVINDICACIONES

1. Un chip de matriz de micropocillos fabricado de silicio y que tiene múltiples micropocillos, usándose cada micropocillo para almacenar una única célula orgánica de muestra, en el que cada micropocillo es de un tamaño y forma que mantiene sólo una célula orgánica y en el que la superficie interior de dichos micropocillos está recubierta con una película de fluorocarbono o una película de óxido de silicio.
2. El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada uno de dichos micropocillos es de forma cilíndrica, poliédrica compuesta de múltiples superficies, cónica inversa, piramidal inversa, o una combinación de dos o más de las anteriores.
3. El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el diámetro del círculo más grande que se puede inscribir dentro de la forma plana de los micropocillos entra dentro de un intervalo de 0,5 a 2 veces el diámetro de la célula orgánica que va a estar contenida en los micropocillos, y la profundidad de los micropocillos entra dentro de un intervalo de 0,5 a 4 veces el diámetro de las células orgánicas que van a estar contenidas en los micropocillos.
4. El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha célula orgánica es un linfocito y el chip de matriz de micropocillos se usa para detectar linfocitos específicos de antígeno individuales.
5. El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con la reivindicación 1, empleado de modo que se recupera del micropocillo una sola célula orgánica almacenada en un micropocillo individual.
6. El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una región hidrófoba está proporcionada de manera que rodea dichos múltiples micropocillos sobre dicha superficie principal.
7. El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha región hidrófoba tiene una superficie de silicio o superficie que contiene flúor.
8. El chip de matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el número de micropocillos varía de aproximadamente 2.000 a 1.000.000 por cm^2 .

Fig. 1

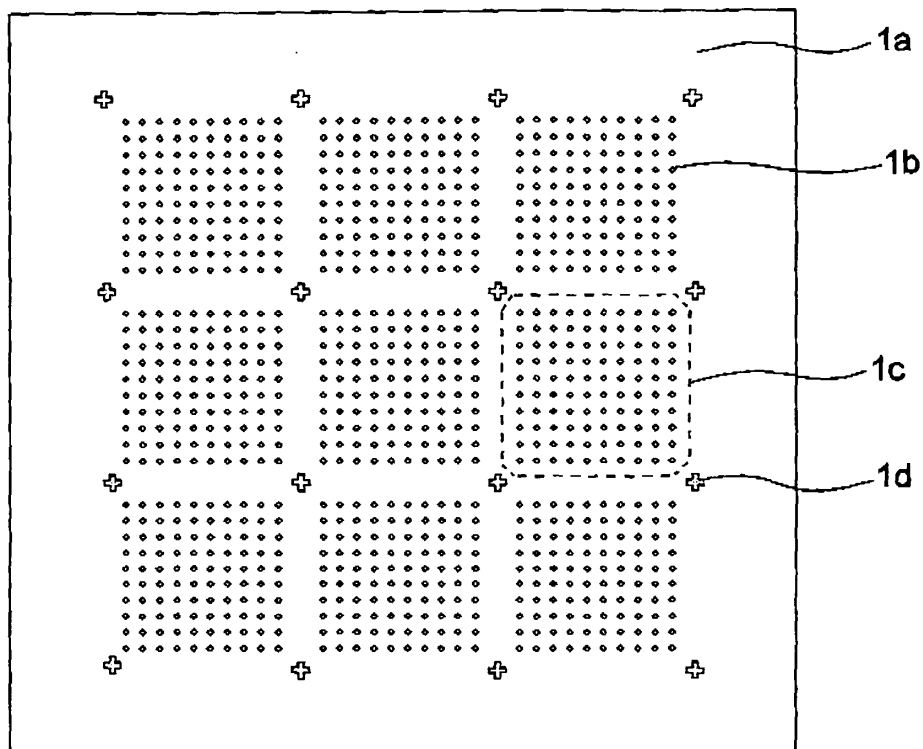


Fig. 2 (I)

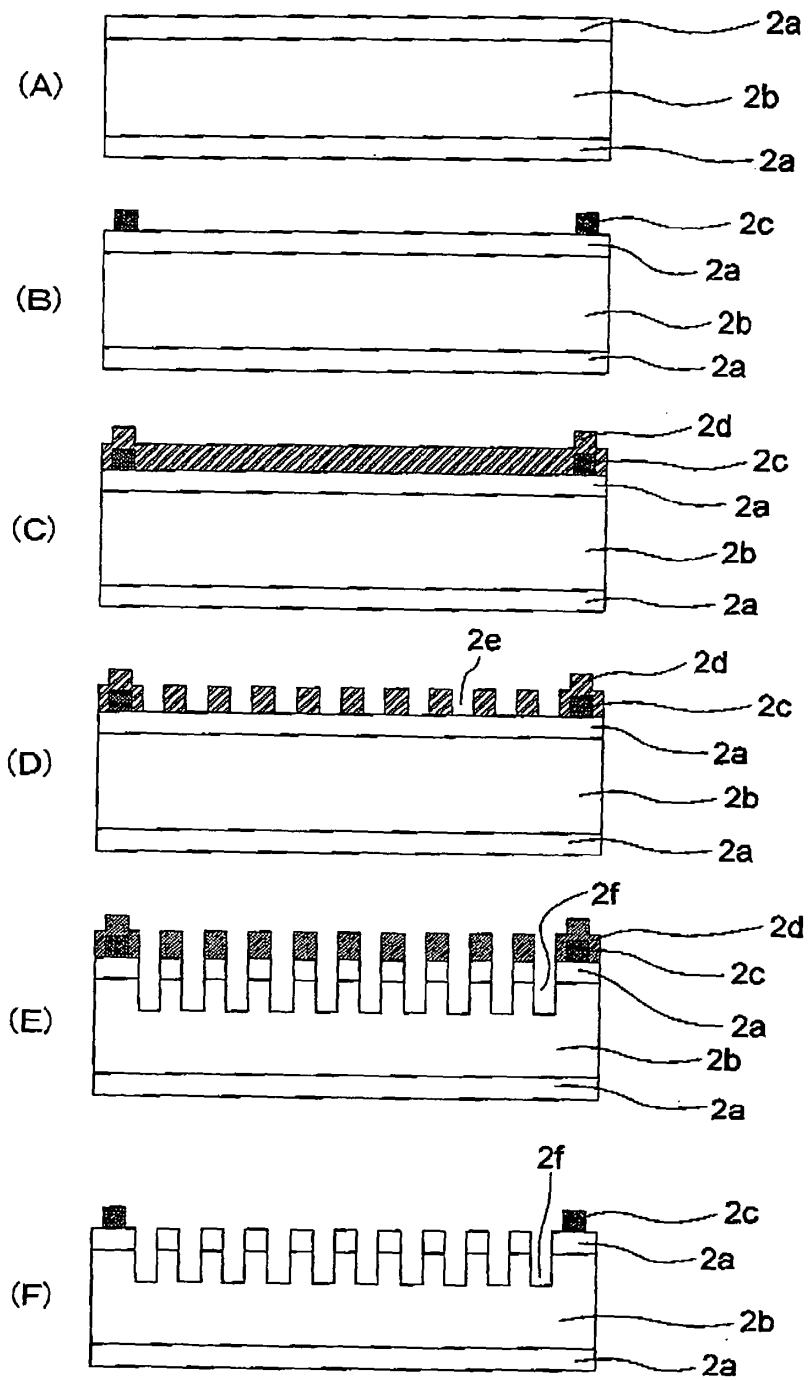


Fig. 2(II)

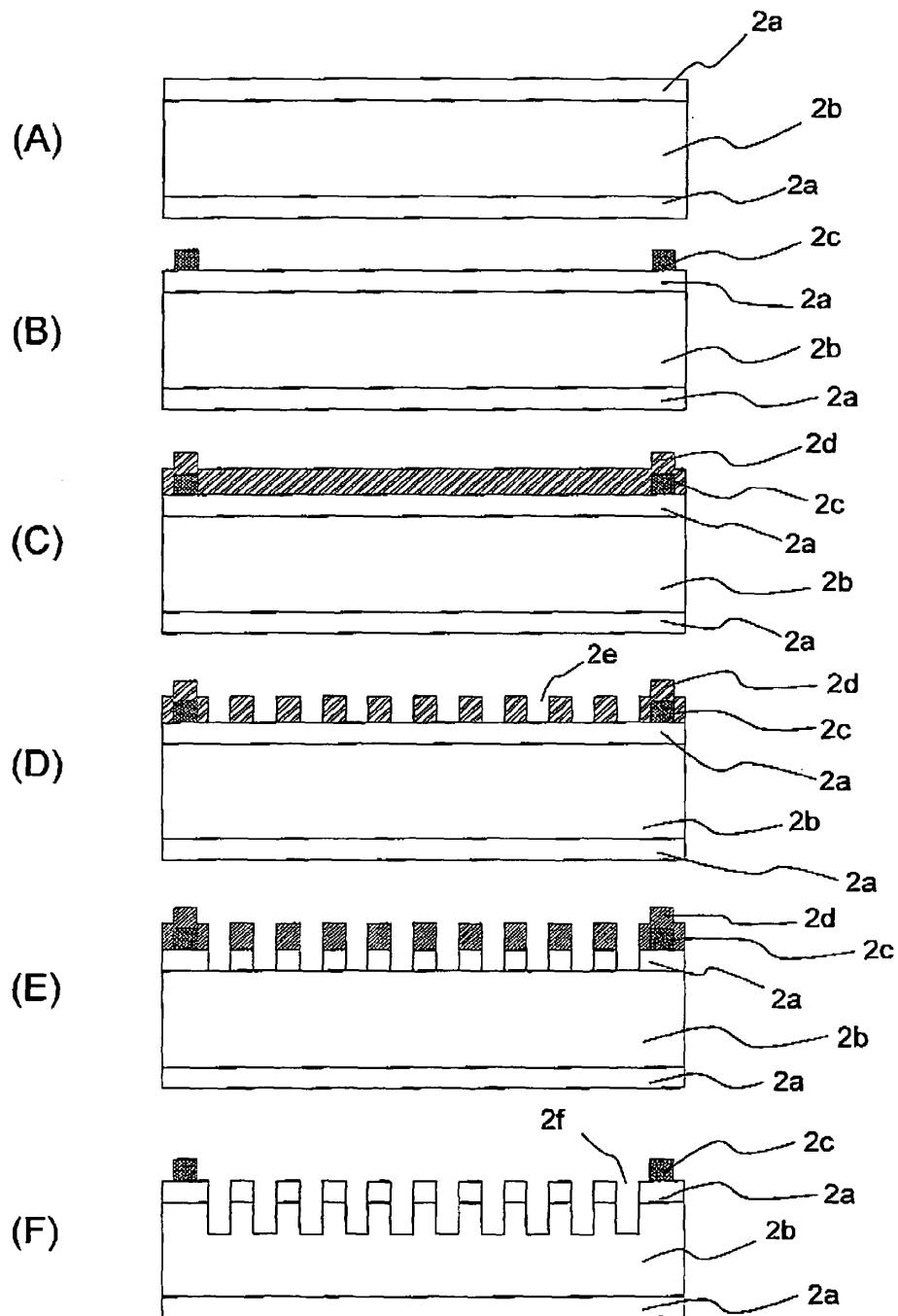


Fig. 3

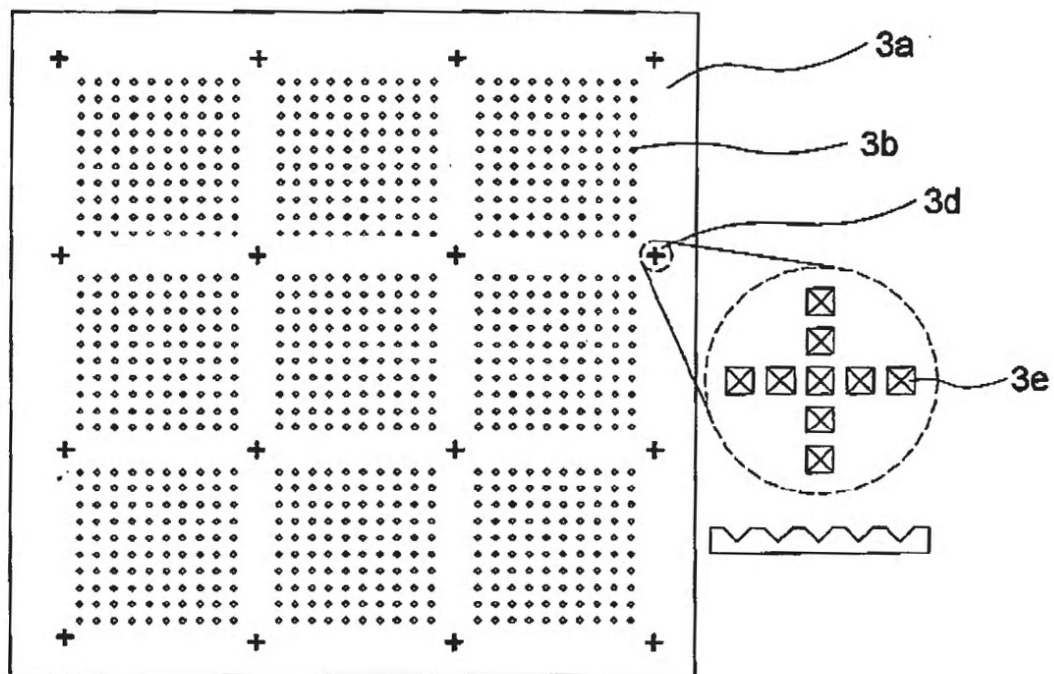


Fig. 4

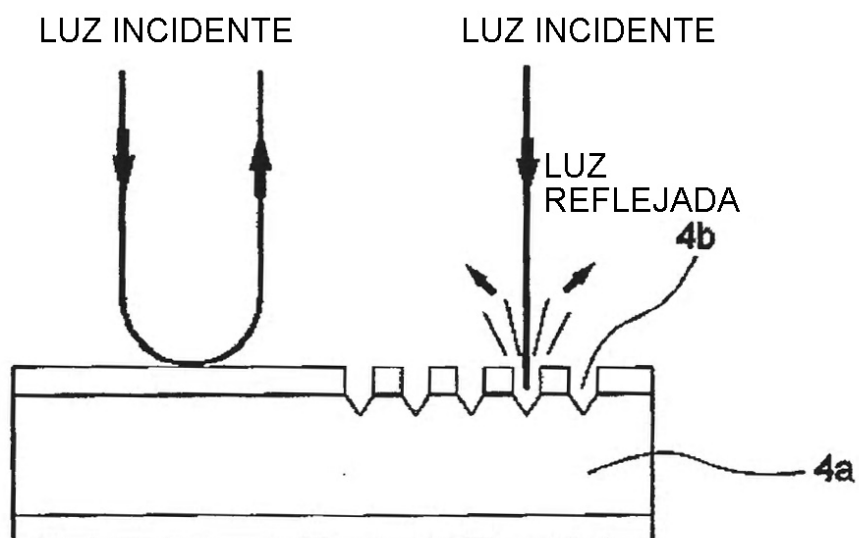


Fig. 5

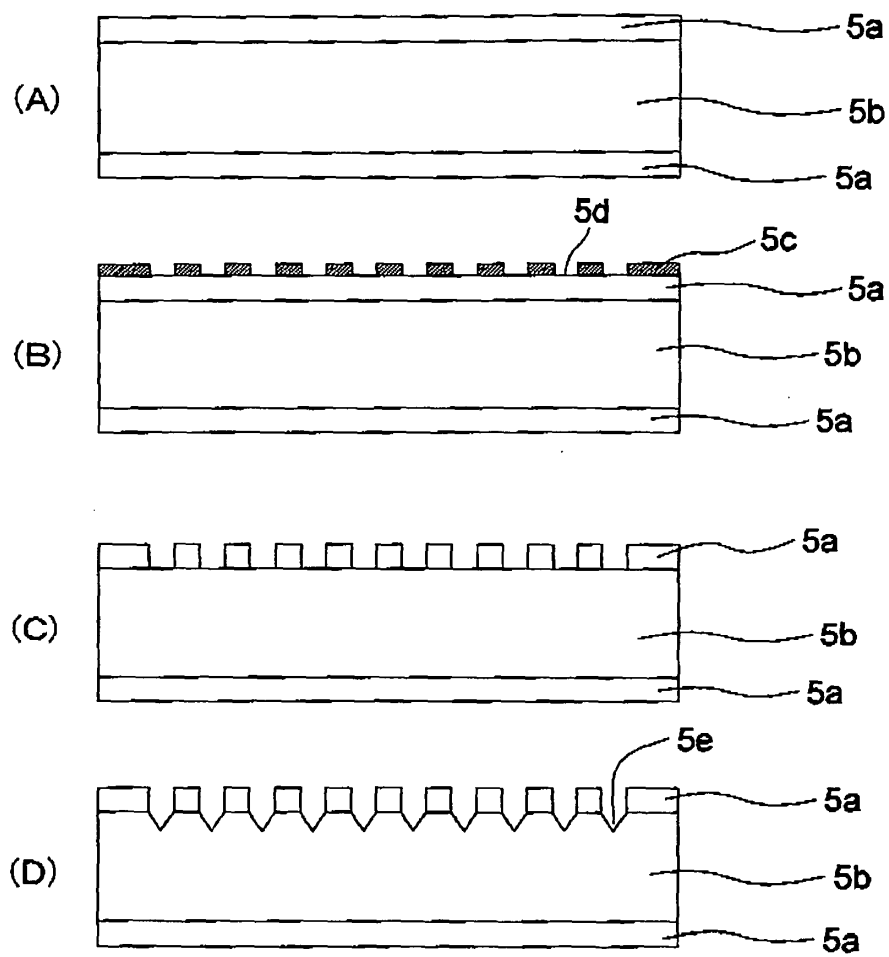


Fig. 6

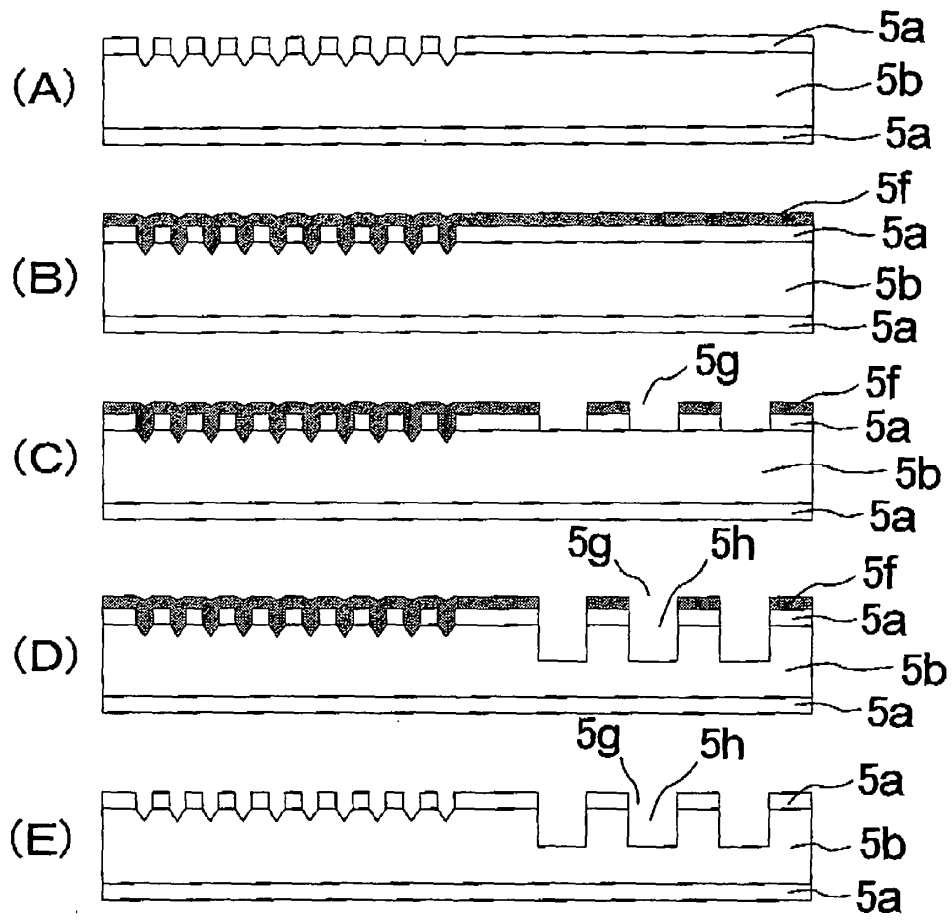


Fig. 7

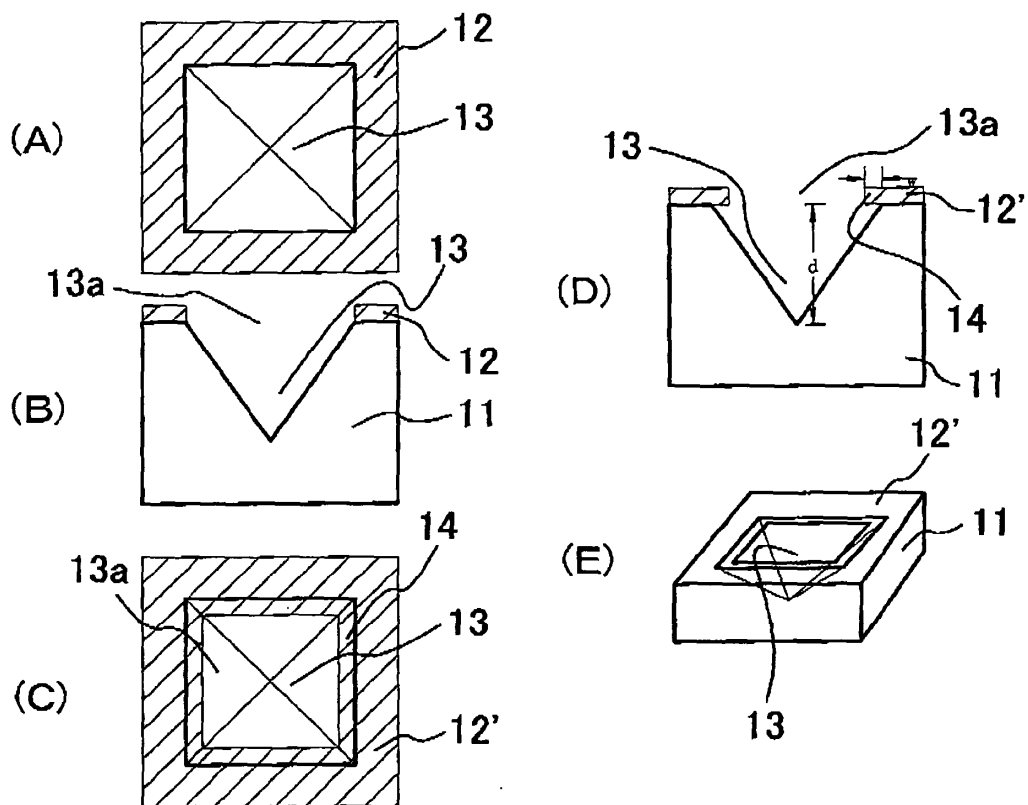


Fig. 8

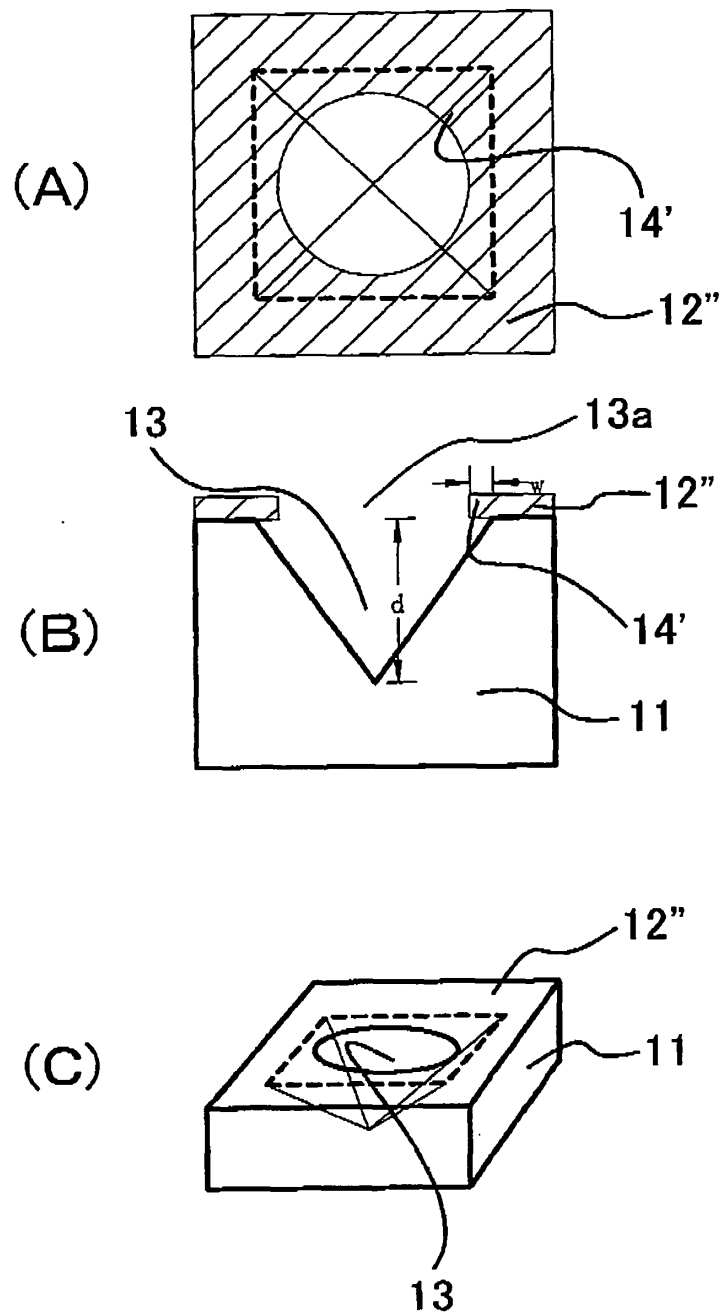


Fig. 9

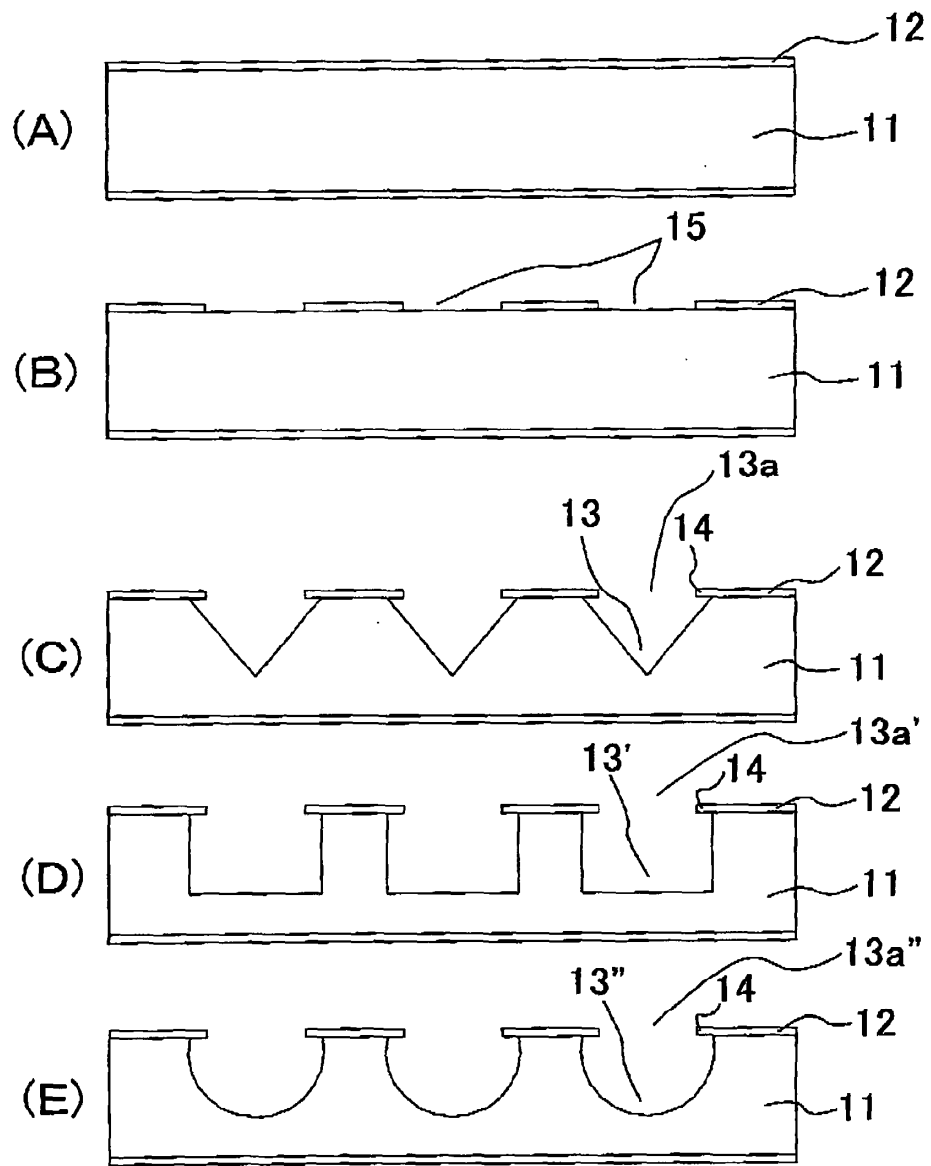


Fig. 10

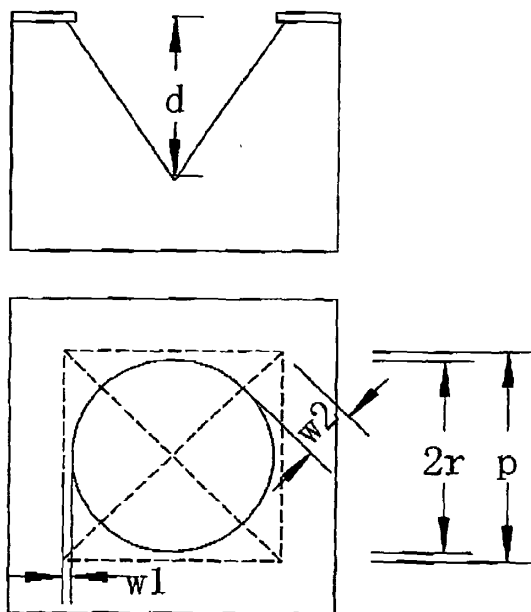


Fig. 11

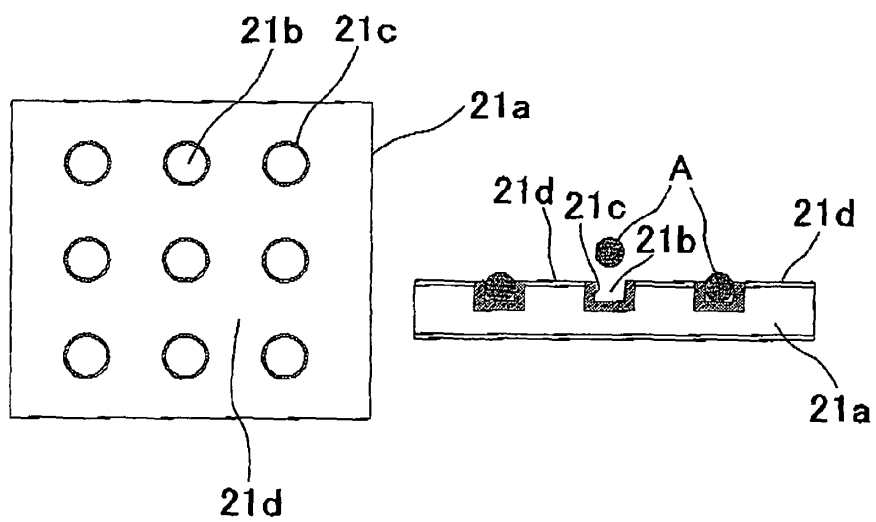


Fig. 12

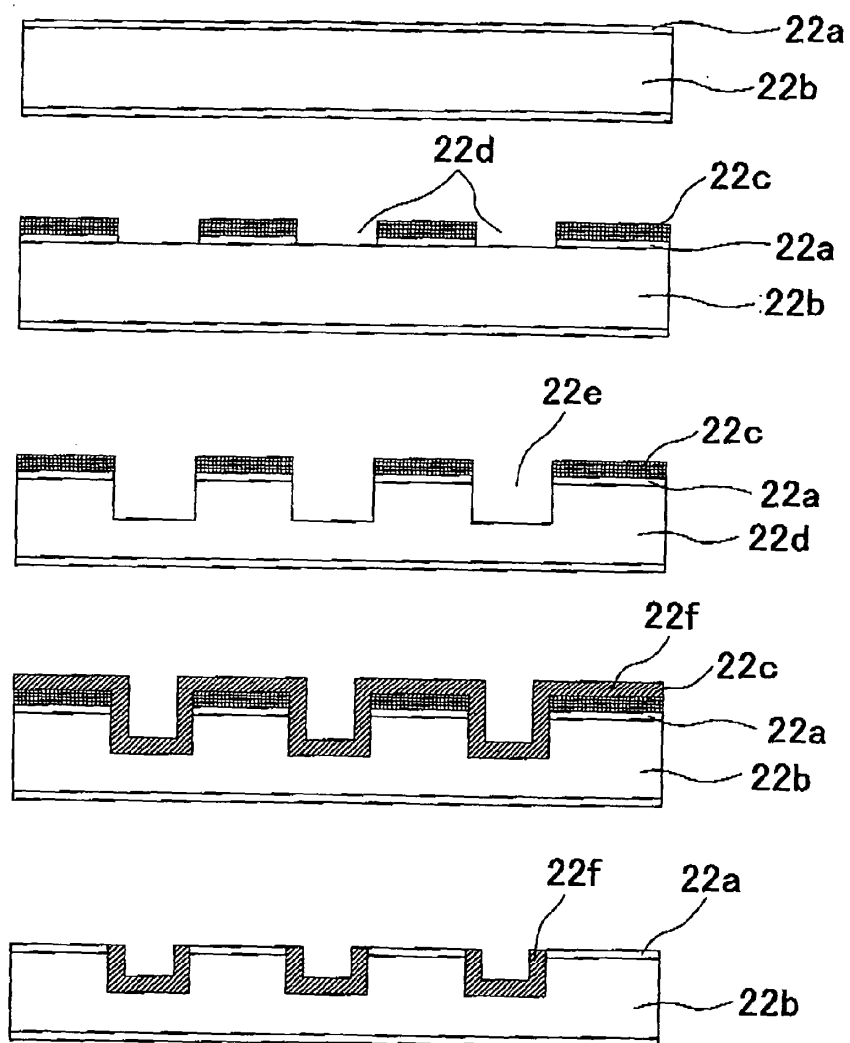
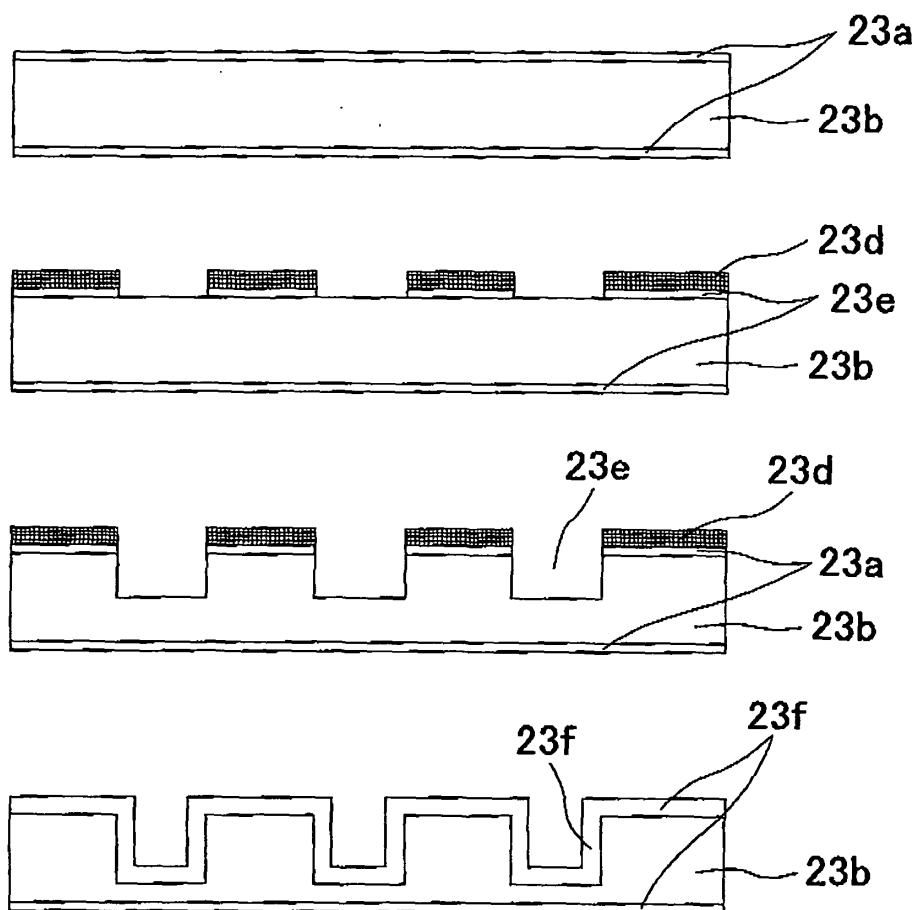


Fig. 13



F i g. 1 4

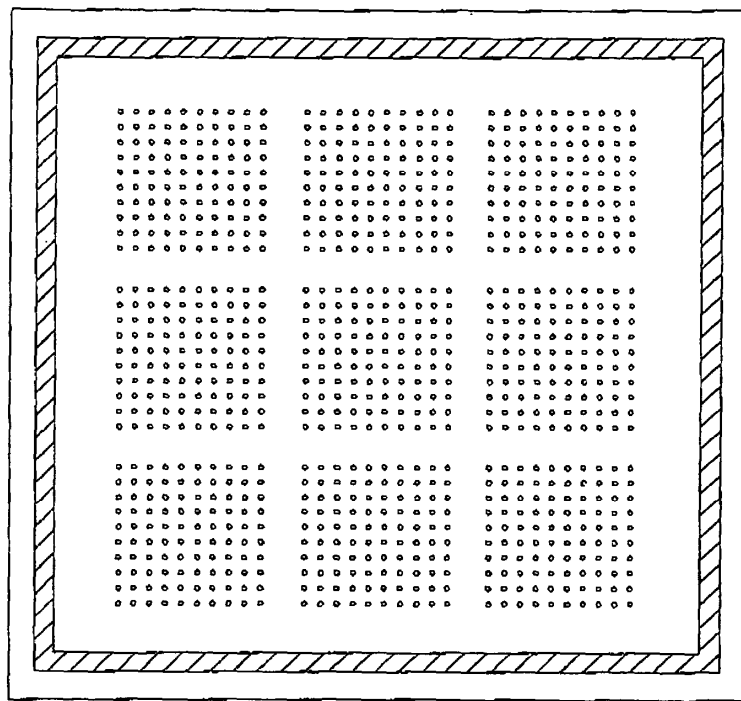


Fig. 15

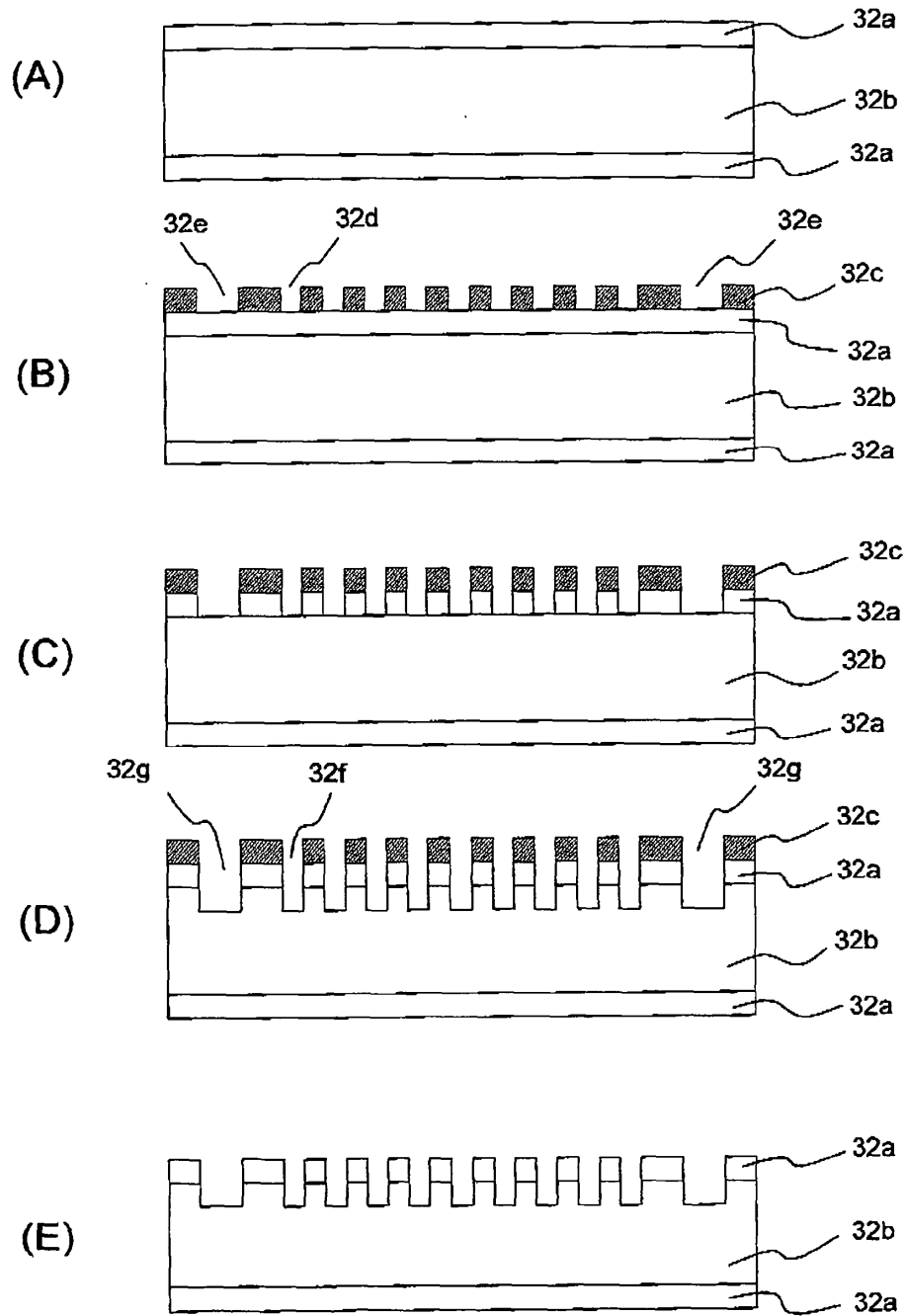


Fig. 16

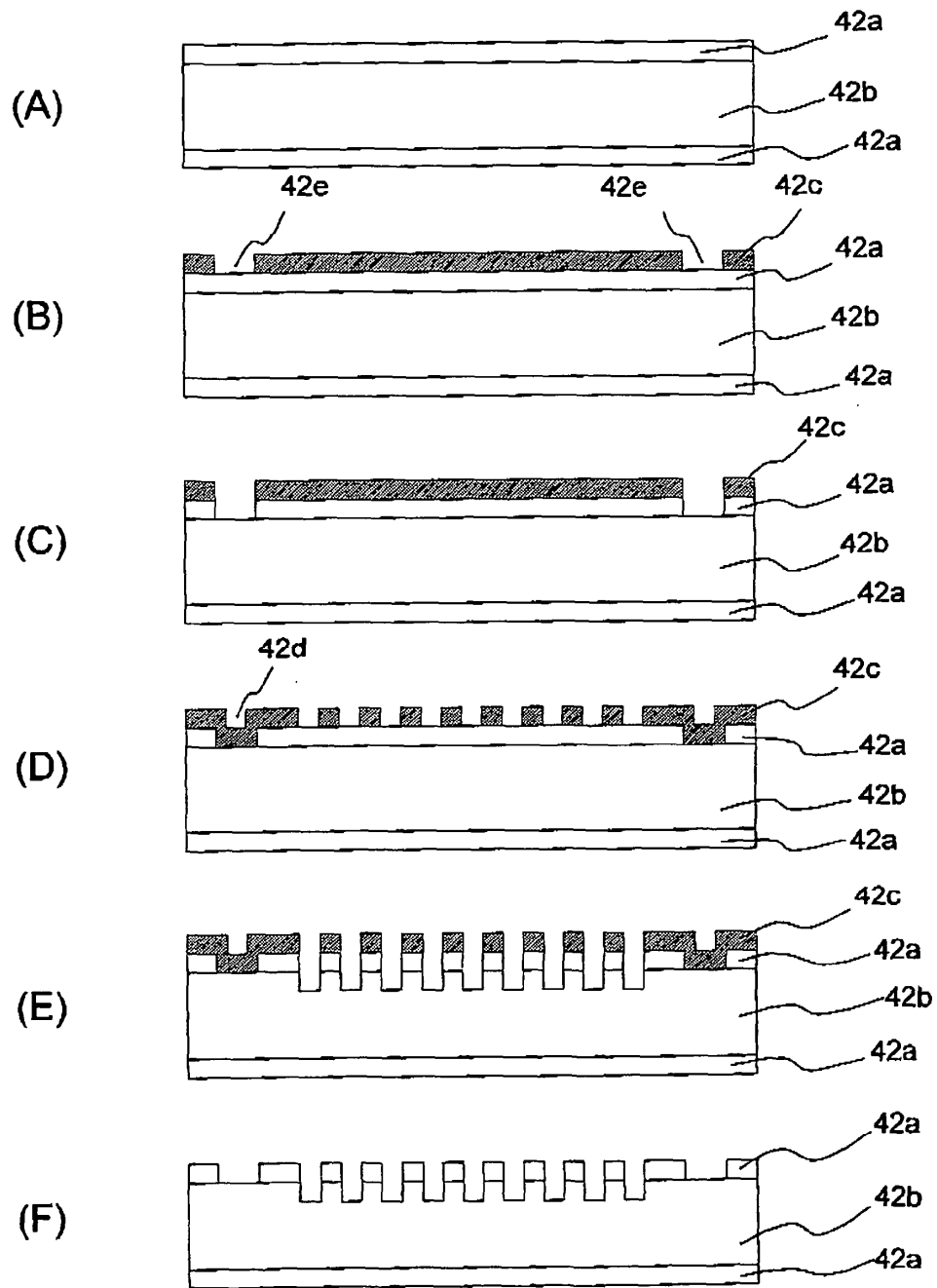


Fig. 17

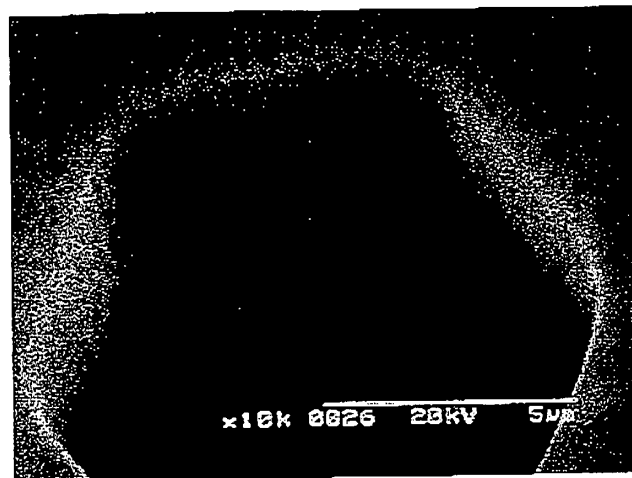


Fig. 18

