

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 523518

(P2003 - 523518A)

(43)公表日 平成15年8月5日(2003.8.5)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/569		G 0 1 N 33/569	B
			G
33/53		33/53	U
33/543	501	33/543	501 J
	525		525 E
審査請求 有 予備審査請求 (全 60数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 560694(P2001 - 560694)

(86)(22)出願日 平成13年2月15日(2001.2.15)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月12日(2002.8.12)

(86)国際出願番号 PCT/US01/04858

(87)国際公開番号 W001/061357

(87)国際公開日 平成13年8月23日(2001.8.23)

(31)優先権主張番号 60/182,941

(32)優先日 平成12年2月16日(2000.2.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ウィスコンシン アラムニ リサーチ フ
ァンデーション
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5370
7 - 7365 マディソン ノース ウォルナッ
ト ストリート 614 ピーオーボックス
7365

(72)発明者 アボット ニコラス エル
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5371
1 マディソン ジェファーソン ストリ
ート 2120

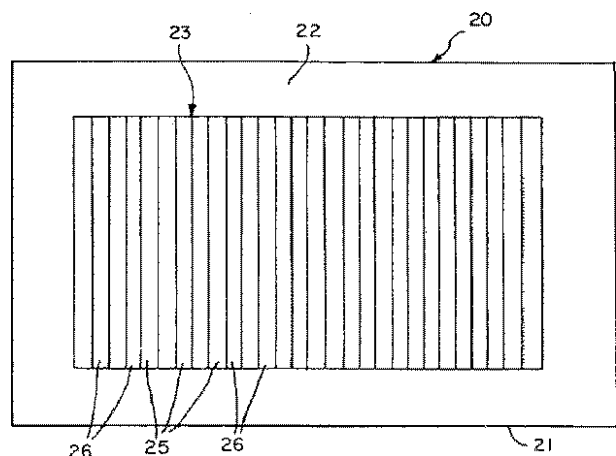
(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外 1 0 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 顕微鏡的病原体の検出方法及び装置

(57)【要約】

サンプル中の選択された病原体の存在の検出用の検出装
置が開示される。このような装置はその表面上に検出領
域を有する支持体（その検出領域は液晶をそれと接触し
て配列するその中に形成された溝を含む微小構造を有し
、溝の幅及び深さは10μm以下の範囲である）；それ
と接触しての液晶材料の整列を乱さない支持体の検出領
域の表面上のブロッキング層（そのブロッキング層はそ
の表面への病原体の非特異的吸着をブロックする）；及
び支持体の検出領域の表面上の結合剤（その結合剤は選
択された病原体を特異的に結合する）を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中の選択された顕微鏡的病原体の存在の検出用の方法であって、以下の工程、

(a) 検出領域をその上に有する支持体を用意する工程であって、該支持体が、表面を有し、該表面が、液晶材料を接触して配列するサイズの幅及び深さのくぼみを含む微小構造を含み、前記くぼみが、選択された病原体により占有されるのに十分なサイズのものである工程、そして

(b) 前記検出領域の表面を処理して、前記表面への病原体の非特異的結合をブロックし、かつ検出すべき前記選択された病原体と特異的に結合する結合剤を含む層をその上に提供する工程、を有することを特徴とする方法。

【請求項2】 特定病原体の存在について試験すべきサンプルを前記支持体の検出領域の表面に適用し、その後に、前記支持体の表面への病原体粒子の結合の不在下で、該支持体の表面上の微小構造により配列される検出領域に、前記液晶材料を適用することを更に含み、それによりサンプル中の選択された病原体の存在が支持体に結合された病原体粒子により生じた液晶材料の目視観察できる不規則化により顕在化される請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項3】 前記検出領域の表面の処理が、ウシ血清アルブミンを前記支持体の検出領域の表面に適用することを含む請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項4】 前記検出領域の表面の処理が、免疫グロブリン又はその部分を選択された病原体に特異的な結合部位を与える検出領域表面に適用することを含む請求の範囲第3項記載の方法。

【請求項5】 磁性ビーズを特定病原体の存在について試験すべきサンプルと接触させ、その後に磁性ビーズを支持体の検出領域の表面と接触させ、その後に液晶材料を検出領域に適用することを更に含み、くぼみが病原体と接触した後に磁性ビーズにより占有されるのに十分なサイズのものであり、それによりサンプル中の選択された病原体の存在が液晶材料の目視観察できる不規則化により顕在化される請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項6】 前記磁性ビーズが、試験すべき病原体と特異的に結合する結

合剤を含む表面を有する請求の範囲第5項記載の方法。

【請求項7】 サンプル中の選択された顕微鏡的病原体の存在の検出用の方法であって、以下の工程、

(a) 検出領域をその上に有する支持体を用意する工程であって、前記支持体が、表面を有し、該表面が、液晶材料を接触して配列するサイズの幅及び深さのくぼみを含む微小構造を含み、前記くぼみが、選択された病原体により占有されるのに十分なサイズのものであり、前記検出領域の表面が、表面への病原体の非特異的結合をブロックするように処理され、かつ検出すべき選択された病原体と特異的に結合する結合剤をその上に有する工程、

(b) 特定病原体の存在について試験すべきサンプルを前記支持体の検出領域の表面に適用する工程、そして

(c) その後に、前記支持体の表面への前記病原体の粒子の結合の不在下で、前記支持体の表面上の微小構造により整列される前記検出領域に、前記液晶材料を適用する工程であって、それによりサンプル中の前記選択された病原体の存在がくぼみ中で前記支持体に結合された前記病原体粒子により生じた前記液晶材料の目視観察できる不規則化により顕在化される工程、有することを特徴とする方法。

【請求項8】 前記検出領域の表面が、病原体の非特異的結合をブロックするためのウシ血清アルブミンの層を表面上に含む請求の範囲第7項記載の方法。

【請求項9】 前記検出領域の表面が、前記選択された病原体に特異的な結合部位を与える免疫グロブリン又はその部分を前記検出領域表面上に含む請求の範囲第7項記載の方法。

【請求項10】 前記検出領域の少なくとも一部をケイ素の酸化物、金属の酸化物、金属、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれた無機材料で被覆することを更に含む請求の範囲第1項又は第7項記載の方法。

【請求項11】 前記無機材料が、銀又は金であり、銀又は金の少なくとも一部をメルカプタン又はジスルフィドで処理することを更に含む請求の範囲第10項記載の方法。

【請求項12】 前記支持体が、成形ポリマープラスチックから形成される

請求の範囲第1項又は第7項記載の方法。

【請求項13】 前記成形ポリマープラスチックが、ポリスチレン、ポリシアノアクリレート、又はポリウレタンを含む請求の範囲第12項記載の方法。

【請求項14】 前記成形ポリマーが、ポリジメチルシロキサンである請求の範囲第12項記載の方法。

【請求項15】 前記選択された病原体が、ウイルスであり、前記検出領域の表面上のくぼみが、5nm～500nmの範囲の幅及び深さを有する請求の範囲第1項又は第7項記載の方法。

【請求項16】 前記支持体の検出領域の表面上のくぼみが、約100nmの幅を有する平行な溝を含む請求の範囲第1項又は第7項記載の方法。

【請求項17】 前記溝が、約100nmの幅を有するリッジにより分離される請求の範囲第16項記載の方法。

【請求項18】 前記溝が、約100nmの深さを有する請求の範囲第16項記載の方法。

【請求項19】 前記結合剤が、ペプチド、ポリペプチド、RNA、DNA、ビオチン、アビジン、抗体のフラグメント、抗体、及び糖からなる群から選ばれる請求の範囲第1項又は第7項記載の方法。

【請求項20】 前記選択された病原体が、細菌であり、前記検出領域の表面上のくぼみが、0.1 μ m～10 μ mの範囲の幅及び深さを有する請求の範囲第1項又は第7項記載の方法。

【請求項21】 実質的に全ての結合剤が検出領域のくぼみに配置される請求の範囲第1項又は第7項記載の方法。

【請求項22】 サンプル中の選択された病原体の存在の検出用の検出装置であって、

表面に検出領域を有する支持体であって、該検出領域が、その中に形成された溝を含む微小構造を有し、該溝が、それと接触して液晶材料を配列し、該溝の幅及び深さが、10 μ m以下の範囲である支持体、

該支持体の前記検出領域の表面上のブロッキング層であって、それと接触する液晶材料の整合を乱さず、前記表面への病原体の非特異的吸着をブロックするブ

ロックキング層、及び

前記支持体の該検出領域の表面上の結合剤であって、選択された病原体を特異的に結合する結合剤、を含むことを特徴とする検出装置。

【請求項23】 前記選択された病原体が、ウイルスであり、前記溝の幅及び深さが、5nm～500nmの範囲である請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項24】 前記溝が、100nm以下の程度の幅を有するリッジにより分離される請求の範囲第23項記載の検出装置。

【請求項25】 前記検出領域の少なくとも一部が、ケイ素の酸化物、金属の酸化物、金属、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれた無機材料で被覆される請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項26】 前記無機材料が、銀又は金であり、銀被覆領域又は金被覆領域の少なくとも一部が、メルカプタン又はジスルフィドとの金又は銀の反応生成物を含む請求の範囲第25項記載の検出装置。

【請求項27】 前記支持体が、ポリマープラスチックから形成される請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項28】 前記ポリマープラスチックが、ポリスチレン、ポリシアノアクリレート、又はポリウレタンを含む請求の範囲第27項記載の検出装置。

【請求項29】 前記ブロックキング層が、ウシ血清アルブミンから形成される請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項30】 前記結合剤が、選択された病原体と特異的に結合する免疫グロブリン又はその部分を含む請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項31】 前記結合剤が、ペプチド、ポリペプチド、RNA、DNA、ビオチン、アビジン、抗体のフラグメント、抗体、及び糖からなる群から選ばれる請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項32】 前記選択された病原体が、細菌であり、前記溝の幅及び深さが、0.1μm～10μmの範囲である請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項33】 前記支持体が、ポリジメチルシロキサンから形成される請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項34】 前記支持体が、該支持体の表面上のアレイ中に多くの検出領域を有し、該検出領域の夫々が、異なる特定病原体と結合する結合剤をその上に有する請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項35】 前記検出領域が、第一検出領域であり、前記支持体が、該支持体の表面上に少なくとも第二検出領域を更に含み、該支持体の少なくとも第二検出領域が、接触して液晶材料を配列する幅及び深さを有するその中に形成された溝を含む微小構造を有し、少なくとも第二検出領域中の溝の幅が第一検出領域中の溝の幅とは異なり、少なくとも第二検出領域中の溝の深さが第一検出領域中の溝の深さとは異なり、又は少なくとも第二検出領域中の溝の幅及び深さの両方が第一検出領域中の溝の幅及び深さとは異なる請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項36】 実質的に全ての前記結合剤が、前記検出領域の溝中に配置される請求の範囲第22項記載の検出装置。

【請求項37】 サンプル中の選択された病原体の存在の検出用のキットであって、

(a)以下の要素、

(i)表面上に検出領域を有する支持体であって、該検出領域がその中に形成された溝を含む微小構造を有し、該溝と接触して液晶材料を配列する溝の幅及び深さが10 μ m以下の範囲である支持体、

(ii) 前記支持体の前記検出領域の表面上のブロッキング層であって、それと接触する液晶材料の整合を乱さず、かつその表面への病原体の非特異的吸着をブロックするブロッキング層、及び

(iii)前記支持体の前記検出領域の表面に付着した結合剤であって、選択された病原体と特異的に結合する結合剤、
を有する支持体、並びに

(b)前記検出領域に結合される病原体の不在下で、前記支持体の該検出領域と接触する場合に配列される液晶材料、
を含むことを特徴とする検出用のキット。

【請求項38】 前記選択された病原体が、ウイルスであり、前記溝の幅及

び深さが、5nm～500nmの範囲である請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項39】 前記溝が、100nm以下の程度の幅を有するリッジにより分離される請求の範囲第38項記載のキット。

【請求項40】 前記検出領域の少なくとも一部が、ケイ素の酸化物、金属の酸化物、金属、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれた無機材料で被覆される請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項41】 前記無機材料が、金又は銀であり、銀被覆領域又は金被覆領域の少なくとも一部がメルカプタン又はジスルフィドとの金又は銀の反応生成物を含む請求の範囲第40項記載のキット。

【請求項42】 前記支持体が、ポリマープラスチックから形成される請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項43】 前記ポリマープラスチックが、ポリスチレン、ポリシアノアクリレート、又はポリウレタンを含む請求の範囲第42項記載のキット。

【請求項44】 前記ブロッキング層が、ウシ血清アルブミンから形成される請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項45】 前記結合剤が、選択された病原体と特異的に結合する免疫グロブリン又はその部分を含む請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項46】 前記結合剤が、ペプチド、ポリペプチド、RNA、DNA、ビオチン、アビジン、抗体のフラグメント、抗体、及び糖からなる群から選ばれる請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項47】 前記選択された病原体が、細菌であり、溝の幅及び深さが0.1μm～10μmの範囲である請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項48】 前記支持体が、その中に成形された溝を有するポリジメチルシロキサンから形成される請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項49】 前記液晶材料が、4-シアノ-4'-ペンチルビフェニルネマチック液晶である請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項50】 前記支持体が、該支持体の表面上のアレイ中に多くの検出領域を有し、前記検出領域の夫々が、異なる特定病原体を結合する結合剤をその上に有する請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項51】 前記検出領域が、第一検出領域であり、前記支持体が、該支持体の表面上に少なくとも第二検出領域を更に含み、該支持体の少なくとも第二検出領域が、接触して液晶材料を配列する幅及び深さを有するその中に形成された溝を含む微小構造を有し、少なくとも第二検出領域中の溝の幅が、第一検出領域中の溝の幅とは異なり、少なくとも第二検出領域中の溝の深さが、第一検出領域中の溝の深さとは異なり、又は少なくとも第二検出領域中の溝の幅及び深さの両方が、第一検出領域中の溝の幅及び深さとは異なる請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項52】 実質的に全ての結合剤が、前記検出領域の溝中に配置される請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項53】 前記検出領域の溝にフィットするのに十分なサイズの磁性ビーズを更に含む請求の範囲第37項記載のキット。

【請求項54】 前記磁性ビーズが、表面を含み、該磁性ビーズの表面が、前記選択された病原体と結合する結合剤を含む請求の範囲第53項記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****（技術分野）**

本発明は一般にサンプル中のウイルス又は細菌の如き顕微鏡的病原体の検出用のアッセイ装置及び方法に関する。

【0002】**（背景技術）**

サンプル中の生物学的物質及び化学化合物の存在の検出方法は分析化学及び生化学の分野における連続の発達の領域であった。環境の如き源又は生きている生物から採取されたサンプル中の種々の標的種の検出を可能にする種々の方法が開発されていた。標的種の検出は処理の規定された方法が試みられ、病気が診断される前に臨床状況でしばしば必要である。

多くの通常のアッセイ方法が標的種の存在を検出するのに非常に良く作用するが、多くの通常のアッセイ方法は高価であり、しかも装置及び高度に訓練した個人をしばしば必要とし、これがそれらをその分野でルーチンで使用することを困難にする。こうして、使用するのに一層容易であり、かつ離れた位置でサンプルの評価を可能にするアッセイ装置及びシステムに対する要望が存する。

【0003】

最近、液晶を使用するアッセイ装置が開示された。例えば、ガラスに斜めに付着された異方性金フィルムで支持されたオクタンチオール及びビオチンを含む混合自己集合単層(SAM)を使用する液晶アッセイ装置が最近報告されていた(Gupra, V. K.; Skaife, J. J.; Dubrovsky, T. B., Abbott N. L. Science, 279, (1998), pp. 2077-2079)。加えて、1999年12月9日に公開されたPCT公開WO 99/63329は支持体に付着されたSAM及びSAMにより固定される液晶層を使用するアッセイ装置を開示している。

異方性金フィルムを使用する開示された液晶をベースとするアッセイ装置は標的種がサンプル中に存在するか否かを測定するのに使用するのに適しているが、斜めの付着による異方性金フィルムの調製が困難である。例えば、斜めに付着された金フィルムの調製は複雑な洗浄工程及び高真空付着を必要とする。それ故、

調製するのに容易であり、かつ擬陽性試験結果を生じ得るタンパク質による非特異的吸着に抵抗する支持体構造に対する要望が存する。

【0004】

(発明の開示)

本発明によれば、細菌及びウイルスの如き顕微鏡的病原体が簡単かつ有効な様式で検出し得る。病原体の検出は特殊な実験設備又は装置を必要としないで最小のトレーニングを有する個人により行ない得る。検出は通常血清学的試験より速い様式の正確な読み取りを与えられる。単一試験で多種の顕微鏡的病原体についてスクリーニングすることが可能である。

【0005】

本発明の検出装置は液晶材料を接触して配列するサイズの幅及び深さのくぼみを含む微小構造を含む検出領域をその上に有する支持体を含む。くぼみはまた検出すべき病原体により占有されるサイズにされる。くぼみは平行な微小溝を含んでもよい。ウイルスの検出のために、微小溝の幅及び深さは一般に5nm～500nmの程度であり、一方、細菌の検出のために、微小溝の幅及び深さは一般に0.1μm～10μmの程度であろう。支持体上の微小構造は、硬化性ポリマー材料を成形すること、微小加工金型を利用することを含む、種々の好適な技術、またその他の方法、例えば、機械エンボス又は弾性材料、例えば、ポリジメチルシロキサンを使用してマスターからレプリカを形成し、次いで弾性レプリカを使用してポリウレタン、ポリシアノアクリレート、及びポリスチレンを含むその他のポリマー材料からレプリカを形成することにより形成されてもよい。検出領域の表面は表面への病原体の非特異的結合をブロックするように処理され、検出すべき選択された病原体を特異的に結合する結合剤を含む。

【0006】

検出装置は検出領域の少なくとも一部が無機材料、例えば、ケイ素の酸化物、金属の酸化物、金属、又はこれらの組み合わせで被覆されてもよい点で更に具体化されてもよい。金属被覆領域、例えば、金被覆領域又は銀被覆領域はメルカプタン又はジスルフィドとの金属被覆領域の反応生成物である領域を含んでもよい。更に別の実施態様において、実質的に全ての結合剤が検出領域の表面上のくぼ

み中に配置される。

選択された病原体の存在についてサンプルを試験するために、サンプルが検出領域の表面に接触されて病原体粒子（存在する場合）が結合剤により表面に結合され、くぼみを占有することを可能にする。その後に液晶材料が検出領域に適用され、それが表面への粒子の結合の不在下で支持体の表面上の微小構造により配列されるであろう。粒子が表面に存在しない場合、液晶材料が配列され、典型的には適当な偏光視覚化材料を利用することにより、目視試験された場合に一樣かつ暗く見える。特定病原体がサンプル中に存在する場合、それは結合剤に結合され、支持体の表面上のくぼみを実質的に占有するであろう。粒子によるくぼみの占有は液晶材料の一樣な整列を乱し、その結果、検出領域は適当な偏光材料で視覚化された場合に比較的明るく着色されて見える。この様式において、観察者は特定病原体がサンプル中に存在するか否かを容易に測定し得る。支持体上のくぼみは表面に結合し得るタンパク質の如き分子物質と較べて十分に大きく、こうしてタンパク質又はその他の分子物質の非特異的結合は液晶材料の一樣な整列を乱さない。

【0007】

多種の支持体が使用でき、又は単一支持体の検出領域の表面は検出領域の種々の領域が異なる特定病原体の結合剤を夫々有するようにパターン化されてもよい。これは単一サンプルが種々の病原体の存在について同時にチェックされることを可能にする。検出装置は多くの検出領域がユニタリ支持体上に用意されて数種の病原体の存在についてのサンプルのスクリーニングを促進するマイクロアレイで更に具体化されてもよい。更に、検出装置はそれが二つ以上の検出領域を含み、その結果、検出領域が異なる幅、深さ又はその両方の溝を有し、その結果、検出装置の異なる領域が単一の特定病原体に対し異なる感度を有する点で更に具体化されてもよい。

ウイルスの非特異的吸収をブロックするのに使用し得る例示の材料はウシ血清アルブミン(BSA)である。例示の結合剤は免疫グロブリンもしくはその部分又は特定ウイルスへの結合のために選択された抗体もしくはその部分である。しかしながら、あらゆる好適なブロッキング層材料及び結合剤が本発明に利用し得るこ

とが理解される。

本発明の更なる実施態様において、磁性ビーズが本発明の検出装置及び方法と連係して使用し得る。このような実施態様において、ビーズの表面は選択された病原体を結合する結合剤を含んでもよい。ビーズはサンプルと接触され、続いて検出領域と接触されてもよい。病原体がサンプル中に存在する場合、それはビーズの表面に結合し、その結果、ビーズが検出装置の検出領域中の結合剤に結合する。

本発明の更なる目的、特徴及び利点は添付図面と一緒にされた場合に以下の詳細な説明から明らかであろう。

【0008】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明は簡単かつ有効な様式でウイルスの特定株の如き病原体の検出に特に利用し得る。天然産病原体及び遺伝子操作病原体の両方が重大なヒト及び動物の健康上のリスクを課し、これは迅速な検出により著しく軽減し得る。世界保健機構、疾患防除センター、並びに米国国防省及び農務省のような多岐にわたる当局の全てが地方レベル及び国内レベルで行なう決定を知らせるために潜在的な公衆健康緊急事態の最も早い段階における迅速かつ正確な情報の重要性を強調している。本発明はこのような要望を満足するのに良く適している。それは研究所又は特別に訓練された人を必要としないで当分野で使用し得る。それは血清中和(SN)、補体固定(CF)、赤血球凝集抑制(HI)、単一ラジアルヘモリシス(SRH)、逆免疫電気泳動(CIEOP)、蛍光抗体(FA)、又はELISAの如き通常の血清学的試験よりも速い正確な読み取りを与える。本発明は患者又は環境からのサンプルが病原物質の非常に広いスペクトルについて同時に探査されることを可能にするアドレス可能なマイクロアレイで具体化し得る。更に、抗体をウイルス、リケッチア、及び細菌の表面タンパク質に固定することにより、遺伝子分析よりも速い武装化組換え生物の組織標的及び侵入の経路を同定することが可能である。検出装置はまた生物学的物質及び化学物質の両方を検出することができる埋め込まれたセルを含む一層複雑な装置の“ プレスクリーニング・フロント-エンド ” として利用できる。

【0009】

口蹄疫ウイルスは輸入、所有、又は使用がUSDA規制のもとに禁止されている動物病原体の例である。この物質はまた武装化にあり得る候補と同定されていた。水疱性口内炎ウイルス(VSV)はウシの臨床上区別できない非致死性感染症を生じ、北米及び南米の頻繁な動物間流行病の原因である。両方の疾患では、口の病巣が多数のウイルス粒子を含む。本発明の検出装置に固定されたVSV-NJ、VSV-インジアナ、及び口蹄疫ウイルスの抗体により、当分野の獣医が即時の診断を行ない、群れの損失及び人畜共通のリスクを最小にすることができる。

気管支肺胞灌流はサイトメガロウイルスの迅速なウイルス診断を得るために肺の症候群の患者に行なわれる操作である。この操作を行なう際に、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス及びエンテロウイルスがまた検出された。単一操作から回収された物質の量は少なく、夫々のウイルス試験が別個のサンプルを必要とする。本発明は全てのこれらの病原体だけでなく、細菌物質、例えば、L.ニューモフィラ、M.ツベルクロシス、又は非定型ミコバクテリア物質、例えば、M.カンサシイもしくはM.アビウムの同時検出に使用し得る。最小の追加のコストについて、或る範囲の稀な、しばしば見過ごされる、原因物質が一層可能な候補と同じアッセイに含まれる。

【0010】

本発明を例示する目的のために、本発明の検出装置の支持体の簡素化された平面図が図1に一般に20で示される。支持体20は好ましくは検出領域23を包囲する平らな上表面領域22を有する材料、例えば、ポリマープラスチックのベースプレート21から形成される。更に以下に説明されるように、検出領域23はくぼみを有する微小構造から形成され、これは図1及び図2に示されるようにくぼみを分離する隣接リッジ25、好ましくは溝26を含んでもよく、溝は検出領域23を横切って互いに平行に配置される。溝26の幅及び深さ、並びにリッジ25の上部により形成された溝の間隔は、液晶材料に溝及びリッジによりその上に押し付けられる一様な配向をとらせるように選択される。溝のサイズ及び溝の間隔はまた病原体粒子又は適当なサイズの粒子の塊の接着が液晶材料の一様な配向を乱し、液晶の外観の目視できる変化を生じてウイルスの検出を観察者に信号で送るよう選択される。種々の通常の液晶材料が利用されてもよく、ネマチック液晶及びスメクチック

ク液晶が挙げられる。液晶はサーモトロピック相又はリオトロピック相であってもよい。一般に、ウイルスにより占有されるのに適している溝の幅及び深さは5~500ナノメートル(nm)の範囲であり、またリッジ25による溝26の間隔は同じ範囲であってもよい。選択された病原体が細菌である場合、溝の幅及び深さは溝が細菌により占有されることを可能にするために一般に0.1マイクロメートル(μm)~10 μm の範囲であろう。溝は種々の形状、例えば、正方形、矩形、三角形、又は半円形であってもよく、典型的にはナノ寸法で若干丸形又はくさび形に形成されるであろう。溝の幅は個々の病原体粒子のサイズ付近であるように選ばれることが好ましく、その結果、粒子が溝に少なくとも部分的にフィットして溝を占有するであろう。くぼみ26は線形の平行な溝以外の形状、例えば、楕円、トランケート溝、異なる幅、深さ及び形状の溝の混合物で形成されてもよく、液晶に作用してそれを所望の一樣の配向に配向させるように選ばれる。

【0011】

本発明の装置は図1に示された形態20の溝付き支持体それ自体を利用してもよい。本発明の装置はまた図2の断面図に更に示されるように液晶材料を覆うためのカバーパネルとともに利用し得る。支持体20は上記と同じ様式で形成され、選択され、調節された寸法のリッジ25により隔置された溝26を有する。スペーサー又はガスケット30が非組織化表面22に取り付けられて検出領域23を完全又は部分的に包囲し、カバープレート31を支持する。支持体20、スペーサー30及びカバープレート31は液晶材料を含み得る体積32を密閉する。

リッジ25及び溝26の露出表面は表面へのウイルス、細菌、又はその他の病原体の非特異的吸着を防止するためのブロッキング層として機能する材料の層33を含んでもよく、又はそれで覆われてもよい。例示のブロッキング層材料はウシ血清アルブミン(BSA)フィルムを含む。ブロッキング層はその他の動物からのアルブミンから形成されてもよいだけでなく、支持体の表面でのポリエチレンオキサイドの固定化により形成されてもよい。双性イオンポリマーがまた非特異的吸着を低下するであろう。支持体の材料それ自体はまた病原体の非特異的吸着を防止するように選ばれてもよい。更なる例として、支持体のポリマーは非特異的吸着を防止するためにオリゴエチレングリコールストランドを使用して誘導体化されて

もよい。本発明によれば、層33中又はその上の検出領域表面上の結合剤が検出すべきウイルスを特異的に結合する。層33はそれ自体が液晶材料の様な配向を乱さないように選ばれる。

【0012】

支持体は水への暴露後に安定であるあらゆるポリマーを含む種々の材料から形成されてもよい。例として、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ポリシアノアクリレート、ポリウレタン、及びポリイミドが挙げられるが、これらに限定されない。支持体の一つの好ましい群はポリウレタン、ポリシアノアクリレート、又はポリスチレンから形成される。ポリスチレンが本発明における使用に特に好ましい支持体である。別型はスピンオンガラス、例えば、湿式化学的ゾル-ゲル方法により形成されたシリカ材料、例えば、テトラエトキシシラン(TEOS)である。この無機材料は成形されてもよい。それはヒドロキシル基を呈するガラスであるので、シラン化学(例えば、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APES))を使用して表面を処理することができる。それは硬質であるので、それはエラストマーよりも溝等の“丸み化”を受け難いかもしれない。

【0013】

検出装置の支持体及び検出領域の微細構成は検出領域の少なくとも一部を無機材料、例えば、ケイ素の酸化物、金属の酸化物、金属、これらの組み合わせ(これらに限定されない)で被覆することにより改良し得る。これは以下に記載されるような真空付着技術を使用して行なわれることが好ましい。銀及び金がこのような微細構成改良における使用に特に好ましい無機材料であり、金が特に好ましい。検出領域の少なくとも一部が金又は銀で被覆される場合、それらは金属表面に結合するメルカプタン又はジスルフィドの如き有機硫黄化合物で処理されてもよい。

【0014】

その中に形成されたくぼみを含む微小構造を含む支持体は種々の製造方法により製造し得る。一つの好適な方法において、金型が通常の微小加工方法により、例えば、シリコン加工片中で形成され、次いでこれは液体ポリマーをそれに適用させ、これが固化される。コンパクトディスク及びホログラフィー格子の製造に

使用されるものと同様のポリマーの機械エンボスがまた使用されてもよい。熱い硬質マスターがガラス転移温度付近に加熱されたポリマーシートにプレスされ、マスター中のレリーフをポリマーに移し、次いでポリマーがマスターの除去の前にそのガラス転移温度以下に冷却される。支持体はまた光重合技術により調製されてもよい。

【0015】

支持体の一つの好ましい調製方法において、シリコン又はその他のマスターがポリジメチルシロキサン(PDMS)又はその他の弾性レプリカを形成するのに使用される。フッ素含有化合物が弾性レプリカをつくる前にシリコンマスターの表面に適用されることが好ましく、その結果、弾性レプリカの除去が一層容易である。次いで弾性レプリカが熱硬化性材料、例えば、エポキシド（これに限定されない）、又は更に好ましくは紫外線硬化性材料、例えば、ポリウレタン、ポリシアノアクリレート、又はポリスチレン（これらに限定されない）からレプリカを形成するためのマスターとして使用されることが好ましい。ポリスチレンがこのようなポリマーレプリカを形成するのに使用するのに特に好ましい材料である。

【0016】

結合剤はペプチド及びポリペプチド；RNAオリゴマー及びDNAオリゴマー；ビオチン；アビジン；糖；抗体；抗体のFABフラグメント及びFAB'フラグメント又はその他の活性フラグメント、例えば、免疫グロブリン（これらに限定されない）、例えば、IgG（これに限定されない）；支持体の表面につなぎ留められた小分子（例えば、薬物）（薬物研究のための小分子／タンパク質-ウイルス相互作用のスクリーニングを可能にする）を含む種々の好適な生物分子認識剤を含んでもよく、そのポリマー材料は結合剤を共有結合するのに使用し得る反応性部分（例えば、SH基）又はウイルスを結合するリガンドを呈する機能性ポリマーであってもよい。IgG、IgA、IgM、IgD、及びIgEを含む免疫グロブリン、並びに免疫グロブリンのフラグメントが好ましい結合剤であり、IgG及びIgGのフラグメントが特に好ましい結合剤である。

結合剤は検出領域の表面及びくぼみに分布されてもよい。しかしながら、実質的に全ての結合剤がくぼみ中に、又は更に好ましくは、検出装置の検出領域の溝

中に配置されてもよい。これはリッジの上部をBSAの如きブロッキング化合物でスタンピングし、次いで検出領域を結合剤で処理することにより行なわれてもよい。結合剤の幾つかが検出領域の非くぼみ領域に吸着されてもよいが、この方法は結合剤の大半がくぼみ中に配置された検出装置を提供する。

【0017】

装置20の使用中に、サンプルが検出領域23の表面に適用され、例えば、分析すべき液体サンプルが図2に示された装置の密閉体積32に注入又は噴射されてもよく、検出領域の表面への検出すべき病原体の結合を可能にするのに十分な時間にわたってそこに留まらせる。次いで液体サンプルが流出又は取り出され、体積32がすすがれ、その後好適な液晶材料が体積32に供給される。カバープレート31（使用される場合）、（又は支持体21もしくは両方）は透明であってもよく、液晶材料の外観の観察を可能にする。液晶の非一様又は不均一の光学的外観（例えば、異なる色の領域又は異なる明度の領域）が検出すべき病原体の存在を信号で伝える。サンプルはまた特別な病原体についてスクリーニングすべきである空気（又はその他のガス）の形態で体積32に与えられてもよい。

【0018】

磁性ビーズは病原体がサンプル中に存在するか否かを測定するために検出装置と連係して使用されてもよい。磁性ビーズが使用される場合、それらは典型的にはサンプルの水溶液と接触させられる。サンプル中の生化学的物質が磁性ビーズの表面に吸着されるであろう。それ故、病原体が存在する場合、それはまたビーズの表面に吸着されるであろう。磁性ビーズの表面は磁性ビーズへの病原体の結合剤を増大するための結合剤を含んでもよい。いずれの場合にも、病原体がサンプル中に存在する場合、吸着された病原体を含むビーズが検出領域のくぼみ中の結合剤に結合するであろう。磁石はビーズを溝に初期に吸込むのに使用されてもよい。磁性ビーズが検出装置と連係して使用される場合、検出領域中のくぼみ又は溝は結合された病原体を含むビーズが溝又はくぼみにフィットし得るような好適なサイズにされるべきである。

【0019】

本発明の例が図3-8を参照して今記載される。この例は電子ビームリソグラフ

イーを使用することにより形成された約100nmの幅及び深さ並びに100nmの間隔を有する溝でパターン化されたシリコンウェハの表面を金型として使用して、ポリジメチルシロキサンのナノスケール成形により形成された弾性支持体20を利用した。100nmの寸法の実質的に正方形の溝及びリッジを有する得られる微小構造が図3の簡素化された断面図に示される。原子力顕微鏡及び走査電子顕微鏡はシリコン鋳型のナノメートルスケールの微細構成がポリマー材料に再生されることを確かめた。BSA（ブロッキング層として）及び免疫グロブリンG（IgG）（結合剤として）の層33が検出領域中の溝26及びリッジ25の表面上にフィルムで形成された。当業者は免疫グロブリンの部分又はフラグメントが全免疫グロブリンに代えて使用し得ることを認めるであろう。説明のために図3に示されるように、フィルム33を形成するために表面に吸着されたBSA分子及びIgG分子のサイズは溝26の寸法と較べて小さかった。溝26の寸法は水疱性口内炎ウイルス(VSV)（典型的にはウイルス粒子サイズ約100nm×45nm）とサイズが匹敵し、その粒子が図3に35で説明のために示される。フィルム33を形成するために、パターン化支持体20が最初にIgGの水溶液に、次いでBSAの水溶液に逐次浸漬される。支持体表面上の分子の得られる層が図5に図示される。

【0020】

この様式で形成されたフィルム33を有する支持体20がその上に液晶材料の層を有した場合、ナノメートル-スケールの溝が形成された検出領域は交差偏光シートの間で見られた時に（溝をアナライザーに平行にして）液晶に一樣に暗く見えるようにさせた。市販の液晶材料、BDHにより製造され、EMインダストリイズ（Hawthorne, New York）から入手し得る4-シアノ-4'-ペンチルビフェニル(5CB)ネマチック液晶が利用された（8CBの如きスメクチック液晶を含む、その他の液晶材料が使用されてもよい）。図4はナノ組織化検出領域23、平らな非組織化領域24、及びスペーサー30の領域を示す。アナライザーによる写真は検出領域23が液晶材料の一樣な固定のために一樣に暗く見え、一方、溝を有しない支持体表面の平らな領域22が明るく着色されることを示した。何とならば、溝がなく、液晶が表面に一樣に固定されないからである。こうして、検出領域中の支持体の表面中のナノスケールの溝26の存在は液晶に一樣な配向（これは層33中で支持体表面

へのBSA及びIgGの吸着により消去されない)をとらせる。

【0021】

図5-7はVSVのインジアナ株であるウイルスの特定株の存在を検出するために液晶と組み合わせてこのような支持体を利用する例の結果を図示する。その中に形成された溝26を有する支持体20の表面が上記のように前処理されて図5に図示されたようなBSA及びIgGの層33を形成し、そのIgGはVSVのインジアナ株に特異的に結合するように選択される(即ち、抗VSV-I IgG)。支持体中の溝26の幅は100nmであり、これはVSVウイルス粒子のサイズ(約100nm×45nm)の程度であり、ウイルス粒子が溝に少なくとも部分的にフィットし、それを占有することを可能にする。それと接触して液晶5CBを有する検出領域のみの写真及び観察は、検出領域中の支持体表面への液晶の様な固定を示す様な暗い外観を示した。同様にBSA及び抗VSV-I IgGで前処理された別の支持体はその後VSVのインジアナ株を含む緩衝剤の液滴を支持体の表面に置くことにより処理された。液滴がガラスカバースリップと支持体の表面の間に閉じ込められた。次いでカバースリップが除去され、支持体の表面が食塩加リン酸緩衝液(PBS)ですすがれ、次いで過剰のPBSを置換するための窒素の流れの下に置かれ、次いで5CB液晶と接触させられた。緩衝剤の液滴が約 10^6 pfu/mlのVSV-Iを含んだ場合、VSV-Iが図6に図示されるようにIgGに結合され、次いで表面と接触する液晶が非一様かつ明るく見えた。この結果はウイルスの存在が液晶の整列に関するナノスケールの溝26の効果を消去することを示す。図7に図示されるように、VSVのニュージャージー株(これはインジアナ株に特異的であるIgGに結合しない)を利用して、更なる実験が行なわれた。この様式で処理された支持体が液晶をそれに適用させた場合、液晶の様な配向が実質的に変化されなかった。上記結果は検出システムがサンプル中のVSVのインジアナ株の存在を同定するのに使用し得ること及び検出装置が同じウイルスの異なる株を区別し得ることを実証する。こうして、そのアッセイはVSVのインジアナ株に特異的である。

【0022】

本発明の検出装置はまた図8に示されるように多くの分離された検出領域が支持体の表面に形成される“ミクロアレイ”で組み込まれてもよい。図8に示され

た支持体40は装置20について上記されたようにその中に形成されたくぼみ（例えば、溝）を有する表面41を有する。全表面41又はその領域は表面への病原体の非特異的結合を防止するブロッキング層を有する。多くの分離された検出領域43が表面41に形成され、これらの夫々が特別な病原体に特異的である異なる結合剤（例えば、特別なウイルス又はウイルスの株に結合する特定IgG）を表面に有する。サンプルが表面41と接触して置かれる場合、サンプル中に存在する病原体がその病原体の結合剤を有する領域43で結合されるであろう。次いで支持体がすすがれ、液晶材料が表面41に適用される。病原体が特別な領域43で見られた場合、液晶はその領域で非一様に見え、観察者にその領域が特異的である病原体のサンプル中の存在を信号で伝え、サンプル中の多くの病原体の存在についてのアッセイを同時に可能にする。

【0023】

上記のように、本発明の検出装置はまた異なる結合剤を含む検出領域を含む“マイクロアレイ”に組み込まれてもよい。同じ病原体に対して異なる感度を有する検出領域を含む検出装置がまたつくられてもよい。このような検出装置は支持体の表面に少なくとも第二検出領域を含む。第二検出領域は第一検出領域中の幅とは異なる幅を有する溝；第一検出領域中の深さとは異なる深さを有する溝；又は第一検出領域中の幅及び深さとは異なる幅及び深さの両方を有する溝を有する。異なる検出領域の溝の寸法の相違は標的種の推測濃度が良く知られていない場合にマイクロアレイが使用されることを可能にする。何とならば、液晶の不規則化をもたらす病原体の濃度は検出領域中の溝の幅及び深さに応じて異なるからであろう。

【0024】

（実施例）

材料

使用したガラス顕微鏡スライドはフィッシャーズ・ファイネスト、プレミアム・グレードであり、フィッシャー・サイエンチフィック(Pittsburgh, PA)から得た。トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチルトリクロロシランをゲレスト(Tullytown, PA)から購入した。1-デカンチオール、1-ヘキサデカンチオー

ル、及び鉍油をアルドリッチ(Milwaukee, WI)から得た。下記のものを熱硬化性又はUV硬化性プレポリマーとして使用した：ポリ(ジメチルシロキサン)(PDMS、シルガード(登録商標)184、ダウ・コーニング社(Midland, MI))；エポキシ樹脂(2-トン(登録商標)クリアー・エポキシ、デブコン(Danvers, MA))；ポリウレタン(PU、NOA61、ノーランド・プロダクツ社(New Brunswick, NJ))；ポリシアノアクリレート(PC、J-91、サマーズ・オブチカル(Fort Washington, PA))；及びポリスチレン(PS、UV-74、サマーズ・オブチカル(Fort Washington, PA))。ウシ血清アルブミン(BSA、無IgG、凍結乾燥粉末)をシグマ(St. Louis, MO)から得、受け取ったまま使用した。BDHにより製造された4-シアノ-4'-ペンチルビフェニルのネマチック液晶(5CB)をEMインダストリーズ(Hawthorne, NY)から購入した。

【0025】

ナノ-パターンを有するシリコンマスター

レプリカ成形のマスター支持体として、パターン化シリコンウェハ(200nmパターン及び50nm深さ)を電子ビームライティング及びエッチングにより調製した。PDMSプレポリマーを成形する前に、初期のシリコンマスターをフッ素化シラン蒸気に暴露することによりそれをシラン処理してPDMSがシリコンマスターの表面に粘着することを防止した。グローブボックス(モデルCC-40、バキューム・アトモスフェアーズ社(Hawthorne, CA))を使用して、これを窒素雰囲気下で行なった。最初に、きれいなシリコンマスターをデシケーター中で支持体に付着し、重質鉍油中のフッ素化シラン(トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチルトリクロロシラン)の3%(v/v)溶液の約2cm上で面を下にして懸垂した。真空ポンプを使用して、デシケーターの内圧をその後約0.1トルの圧力に調節した。約6時間後に、デシケーターに窒素を充満し、サンプルを除去した。フッ素化SAMの存在を基準シリコンウェハ上の水の接触角の測定により確認した。ラメ-ハートモデル100(Mountain Lakes, NJ)接触角ゴニオメータを使用して、接触角を測定した。フッ素化シリコンウェハ上の水の測定された接触角は110°以上であった。

【0026】

PDMSマスターの調製

図9は上記のように調製されたシリコンマスターからPDMSマスターを形成するのに使用した操作を図示する。図9はまたPDMSが種々のポリマーから支持体を形成するのに使用された方法を示す。エラストマーをシリコンマスターからのマスターの形成に使用した。何とならば、それらは比較的大きい面積にわたって表面と一致して接触することができ、かつそれらは硬質マスターから容易に離型し得るからである（約21.6ダイン/cmの低界面自由エネルギー）。更に、エラストマーは典型的には良好な化学安定性を示す。PDMSの液体プレポリマー及び硬化剤の混合物（重量基準で10:1）をプラスチックペトリ皿に入れられたシリコンマスターのパターン化され、フッ素化された表面にそそぐことにより弾性PDMSレプリカを加工した。混合及び注入操作から生じたPDMSプレポリマー／硬化剤混合物中の連行気泡を除去するために、ペトリ皿を約30分間にわたって室温で真空オープンに入れた。次いでプレポリマー混合物を真空オープン中で60℃で1日にわたって硬化させた。硬化後、PDMSレプリカをシリコンマスターから軽度剥離した。最後に、硬化PDMSレプリカをエタノールですすぎ、窒素のガス流のもとに乾燥させた。

【0027】

弾性PDMSマスターからのポリマーレプリカ

弾性マスターを使用する複製はマスター及びレプリカを分離する容易さを増大し、分離中に構造を保護し、かつ複製方法中に生じ得るマスターへの損傷を最小にすることがわかった。上記のように調製されたPDMSマスターを使用して、種々のポリマーレプリカを図9に図示されたようにガラス支持体上に形成した。エポキシプレポリマーの如き熱硬化性ポリマーからこのようなポリマーレプリカを形成するために、PDMSレプリカをガラス支持体に塗布されたエポキシの粘稠な液体プレポリマーの上に置いた。ガラス支持体をホットプレートの上に置き、60℃に加熱し、圧力（約100g/cm²）を2時間適用することによりPDMSレプリカを粘稠なエポキシプレポリマーにプレスした。次いでPDMS及びエポキシの得られる組み合わせを室温に冷却し、その後にPDMSレプリカをエポキシ支持体から剥離した。異なる方法を使用してポリウレタン、ポリシアノアクリレート、及びポリスチレン

を調製するのに使用したようなUV硬化性プレポリマーからレプリカを調製した。

【0028】

このようなUV硬化性プレポリマーでレプリカを調製するために、PDMSマスターを最初にガラス支持体の上に置き、厚さ約100 μm のスペーサーフィルム（デュボン・フィルムズ(Wilmington, DE)）を使用してガラス支持体とPDMSマスターの間のギャップを維持した。シリンジを使用して、液体UV硬化性プレポリマーをPDMSマスターとガラス支持体の間に注入し、次いでこれをホットプレート（約60 $^{\circ}\text{C}$ ）上で毛細管力により充満した。これらのプレポリマーを窒素流のもとに2時間にわたって紫外線（365nm、UV架橋装置、スペクトロニクス社(Westbury, NY)）で硬化させ、オープン中で60 $^{\circ}\text{C}$ で一夜エージングした。PDMSマスターをレプリカの表面から剥離した後、PDMSマスターをエタノールで洗浄した。異なるPDMSマスターを夫々のポリマー材料について使用し、単一PDMSマスターが原子力顕微鏡(AFM)、光学顕微鏡、及び液晶の整列により確認したように複製されたポリマーパターンに認められる変化を生じないで10より多いポリマーレプリカを加工するのに使用し得ることがわかった。

【0029】

水溶液中のポリマーレプリカのインキュベーション

ポリマーレプリカを食塩加リン酸緩衝液（PBS：137mM NaCl、2.7mM KCl、4.3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1.4mM KH_2PO_4 ）又はPBSの1mg/ml BSA溶液中でインキュベートした。水溶液中のインキュベーション後に、ポリマーレプリカを脱イオン水で軽く洗浄し、分析の前に窒素流で乾燥させた。

AFMによるパターン化支持体の像

シリコンマスター、PDMSマスター、及びポリマーレプリカの像を接触様式又はタッピング様式で運転するデジタルインストルメンツ・ナノスコープIII（Santa Barbara, CA）を使用して原子力顕微鏡(AFM)により得た。窒化ケイ素からつくられたカンチレバーを1.0Hzの走査速度でライン当り512サンプル点で使用するサンプルを周囲条件下で像形成した。

【0030】

液晶のホメオトロピック固定のための支持体

約20nmの厚さを有する金の半透明かつ一様に付着されたフィルムを電子ビームエバポレーター (VES-3000-C、Tek-Vacインダストリーズ社(Long Island, NY)) を使用してきれいなガラス支持体上に形成した。ガラススライドをプラネタリー支持体ホルダー (これは好ましい方向ではない金フィルムの一様な付着を得るためにスライドを金源に対しエピサイクリック様式で回転させる) に取り付けた。チタンの約8nmの層を使用してガラスと金フィルムの間の接着を促進した。チタンの付着の速度は約0.02nm/秒であり、圧力は蒸発の前及び間で 1×10^{-6} トル以下であった。混合自己集合単層(SAM)を85%の1-デカンチオール及び15%の1-ヘキサデカンチオール (約1mMの合計濃度) を含むエタノール溶液中の2時間の浸漬後に金の上に形成した。

【0031】

光学セル

フィルムを光学セルに集合することによりパターン転写ポリマーレプリカの表面上のネマチック液晶(5CB)の整列を観察した。二つのガラススライドを対にすることにより光学セルを加工し、一面はガラススライド上に加工されたポリマーレプリカであり、他面は金被覆ガラススライド上に形成された混合SAMであった。これらの両方を上記のように調製した。薄いポリエステルフィルム (約10 μ mの厚さのマイラー (登録商標) ブランドのフィルム (デュポン・フィルムズ(Wilmington, DE))) を支持体の表面の間に挿入することにより二つの支持体を離して保った。セルをガラス顕微鏡スライドの端部に沿って置かれた“ブルドッグ”クリップと一緒に保持した。次いでセルをホットプレートの上に置くことによりそれらを約40℃に加熱した。熱空気銃を使用してセル付近の空気を約40℃に温めた。5CBをガラスシリンジ内でその等方性相 (約35℃) に加熱した。次いで、5CBの液滴をホットプレート上の夫々のセルの端部に置いた。5CBを毛細管力により二つの支持体の間のキャビティに吸込んだ。5CBで一旦充満されると、セルをホットプレートから除去し、空気中で室温に冷却した。冷却後に、5CBの等方性相がネマチック状態に変換した。

【0032】

光学組織の分析

偏光顕微鏡 (BX60、オリンパス(Tokyo, Japan)) を使用してポリマーレプリカ及びネマチック5CBで充満された光学セル中に伝播された光により形成された光学組織を観察した。液晶セルの光学外観の像を偏光顕微鏡に取り付けられたデジタルカメラ (C-2020Z、オリンパス・アメリカ社(Melville, NY)) で捕捉した。ポリマーレプリカの観察のために高品質様式 (1600x1200ピクセルの解像度) を f 11 の口径で 1/6 秒のシャッター速度で使用して写真を得 (顕微鏡セッティング: 最大強さの 100% の光源及び 100% の開放口径)、一方、1/320 秒のシャッター速度をポリマーレプリカから調製された光学セルを観察するために使用した (顕微鏡セッティング: 最大強さの 50% の光源及び 50% の開放口径)。

【0033】

金によるポリマーレプリカの被覆

電子ビームエバポレーター (VES-3000-C、Tek-Vac インダストリーズ社(Long Island, NY)) を使用して、約 10nm の厚さを有する金の半透明フィルムを成形ポリウレタン支持体に付着した。支持体をプラネタリー支持体ホルダー (これは好ましい方向ではない金フィルムの一様な付着を得るためにスライドを金源に対しエピサイクリック様式で回転させる) に取り付けた。チタンの約 3nm の層を使用してポリウレタンと金フィルムの間の接着を促進した。チタン及び金の付着の速度は約 0.02nm/秒であり、圧力は蒸発の前及び間で 1×10^{-6} トル以下であった。

【0034】

金被覆ポリマーレプリカの化学パターン化

PDMS の平らな片 (約 1cmx1cmx1cm) をヘキサデカンチオール の 3mM エタノール溶液で “インキ塗りした”。過剰のインキを PDMS スタンプの表面から除去し、次いでスタンプを 3 分間にわたって流れている窒素の流れの下に置いた。次いでスタンプを更なる圧力を適用しないで金被覆ポリウレタン支持体の表面と接触させた。接触を金被覆支持体とスタンプの間で約 10 秒維持した。この操作は表面上の微細構成の上表面上のヘキサデカンチオール の自己集合単層の形成をもたらす。支持体上の微細構成の側部及び底部は “むき出しの金” であった。次いで全支持体を 30 秒間にわたって $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{OH}$ の 0.1mM エタノール溶液中で浸漬した。この操作は微細構成の側部及び底部で SAM の形成をもたらすが、上部ではもた

らさない。何とならば、それはヘキサデカンチオールから形成されたSAMで既に官能化されたからである。

【0035】

ビオチニル化BSA被覆レプリカへの磁性ビーズの結合

表1に示された特性を有する光学回折格子をESエドムント・インダストリアル・オブチクス(Barrington, NJ)から購入した。

【0036】

【表1】 光学回折格子の性質

サンプル 番号	溝/mm	ブレイズ角度	素材番号
1	300	2° 34'	J43-737
2	600	5° 09'	J43-741
3	600	8° 37'	J43-742
4	600	13° 00'	J41-020
5	600	17° 27'	J43-748
6	600	28° 41'	J43-749
7	1200	36° 52'	J43-754
8	3600	-----	J43-227

【0037】

PDMSプレポリマーを成形する前に、回折格子をフッ素化シラン蒸気に暴露することによりそれをシラン処理してPDMSがその表面に粘着することを防止した。グローブボックス（モデルCC-40、バキューム・アトモスフェアーズ社(Hawthorne, CA)）を使用して、これを窒素雰囲気下で行なった。最初に、格子をデシケーター中で支持体に取り付け、重質鉱油中のフッ素化シラン（トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチルトリクロロシラン）の3% (v/v) 溶液より約2cm上で面を下にして懸垂した。真空ポンプを使用して、デシケーターの内圧をその後

に約0.1トルの圧力に調節した。約6時間後に、デシケーターに窒素を充満し、サンプルを除去した。

PDMSプレポリマーを硬化剤と混合した後(1/10の比率で)、混合物を30分間にわたって60℃で真空オープン中に入れて溶解ガスを除去した。ポリマーを回折格子に注入し、5分間にわたって真空オープンに入れ、次いで60℃で一夜にわたってホットプレートの上に置いた。

【0038】

エポキシ樹脂をOTS処理したガラススライドの上に置き、次いでPDMSマスターをそれに押し付けることにより、エポキシドレプリカをPDMSマスターから調製した。エポキシドをホットプレートの上に30分間置くことによりそれを硬化させた。エポキシレプリカを2時間にわたってビオチン-BSA溶液(PBS中2mg/ml)で処理した。この短い浸漬時間はマイクロメートルのエポキシレプリカの微細構成を破壊しないことがわかった。更に長い浸漬時間は明らかな損傷を生じた。PBS 1ミリリットル当り 6.7×10^9 、 6.7×10^8 、 6.7×10^7 、 6.7×10^6 及び 6.7×10^5 の磁性ビーズを含む水溶液20 μ LをBSA処理エポキシレプリカ又はビオチン-BSA処理エポキシレプリカの上に置いた。磁石を表面の下に置いてビーズをレプリカの表面に吸込んだ。

OTSで処理された顕微鏡スライド及びビオチン-BSA溶液(磁性ビーズを含み、又は含まない)で処理されたエポキシレプリカを使用して液晶セルをつくった。12~15 μ mのスペーサーを使用して、液晶をエポキシ表面とOTS処理ガラススライドの間に入れた。偏光顕微鏡を使用して、セルの光学外観を測定した。

【0039】

結果及び検討

レプリカ成形によるパターン転写

官能化シリコンマスターのSEM像を得てその微細構成特徴を測定した。断面のSEM像は約49nmの深さ及び約200nmの幅を有する周期的構造を含む良く形成された微細構成を示した。シリコンマスター、シリコンマスターから調製されたPDMSレプリカ、及びPDMSレプリカから調製されたポリマーレプリカのAFM像が比較のために得られた。シリコンマスターのAFM像の構造及び形状が図10に示され、それ

は得られたSEM像と一致する。シリコンマスターのAFM像及びSEM像の一致は接触様式で得られたAFM像が信頼できる結果を与え、複製されたポリマー支持体の微細構成を分析するのに使用し得ることを示す。PDMSマスターのAFM像に示された微細構成の低下された品質（図11）は弾性材料のAFM像の特徴である。こうして、PDMSマスターのAFM像に示された微細構成の欠陥はおそらく表面中の実際の欠陥のためではなくプローブによる歪のためである。複製の最も重要な特徴はPDMSマスターから複製されたポリマー支持体中のナノメートル-スケールの構造である。この研究に使用されたポリマー材料は硬化後に硬質フィルムを形成するので、PDMSマスターから形成されたこれらのレプリカのAFM像（図12-15、夫々エポキシ、ポリウレタン、ポリシアノアクリレート、及びポリスチレンから形成されたレプリカのAFM像）は可撓性PDMSレプリカにより示された微細構成（図11）のばらつきを示さない。驚くことに、また予想しないことに、図12-15はシリコンマスター中のパターンの深さ及び幅がPDMSマスターの不十分なAFM像にもかかわらずポリマーレプリカの夫々中で忠実に再生されることを実証する。ポリマーレプリカ中で示されたパターンの深さのわずかな減少はポリマーレプリカをシリコンマスターから形成する際の段階的複製操作により説明される。

【0040】

ポリマー支持体のAFM像は転写されたパターンの形状における異なる性質（例えば、パターン化端部の深さ及び鮮鋭度）を示す。複製が夫々のポリマー材料について少なくとも3回繰り返された。AFM像の観察はポリウレタンレプリカがシリコンマスターからのパターンの転写に最良の総合のパターン品質を有することを示した。硬化後のポリマーレプリカ材料の硬度は殆ど同じ（83～90ショアーD硬度）であるので、パターン品質の相違はPDMSレプリカの場合である異なる硬度（約50ショアーA硬度）の結果ではない。プレポリマーの硬化中の収縮はまた複製されたパターンの品質に影響する重要な因子であるとは考えられない。図12-15は異なるポリマー材料がそれから形成されたレプリカに種々の結果を生じること示すが、図12-15は使用された材料の夫々が更なる研究に十分に適したレプリカを形成したことを示す。

【0041】

水溶液中のインキュベーション後のポリマーレプリカのAFM像

ポリマーレプリカを水溶液中でインキュベートして可能な標的種を含む試験溶液への暴露に耐えるそれらの能力を分析した。詳しくは、ポリマー支持体を1日にわたってPBS溶液中でインキュベートした。次いで、AFMを使用して得られるパターンの構造及び形状を観察した(図16-19)。エポキシレプリカのパターンは水溶液中の浸漬に耐えなかった。水溶液中で1日後に、ガラス上に形成したエポキシ-パターンの殆どが乱れ、ガラスから脱着した。図16はPBS中の1時間のインキュベーション後のエポキシレプリカのAFM像を示す。エポキシレプリカ中のパターンの膨潤がAFM像で明らかである。

【0042】

エポキシレプリカとは対照的に、ポリウレタン、ポリシアノアクリレート、及びポリスチレンから調製されたレプリカのAFM像はPBS中の1日のインキュベーション後のパターンに区別できる変化を示さなかった。即ち、夫々図17-19に示された、PBS中のインキュベーション後のPU、PC及びPSレプリカのAFM像はインキュベーション前のパターンの像(図13-15)と殆ど同じである。しかしながら、PC及びPSレプリカはPBS中の1日のインキュベーション後に顕著に曇った。これは膨潤により生じたと考えられた。これらのレプリカ中の曇りの特徴は窒素による乾燥後に消失した。図18及び19に夫々示されるように、PC及びPSレプリカにおける膨潤はポリマーレプリカ中のパターンのAFM像の認められる変化を生じなかった。膨潤の出現は水溶液中のポリマー支持体の延長されたインキュベーションがポリマーレプリカのパターンを損傷し得ることを示すとしても、構造が影響されなかったという事実はこれらのポリマーが本発明における支持体としての使用に適していることを実証する。エポキシレプリカで見られた膨潤特徴は乾燥後に回復しなかった。曇りはPBS中の1日のインキュベーション後にポリウレタンから調製されたレプリカで観察されず、図13及び17はポリマーパターンの形状及び構造がPBS中のインキュベーション後に変化されなかったことを実証する。

【0043】

交差偏光子の間のポリマーレプリカの光学像

ガラス支持体上に形成されたポリマーレプリカは光学上透明である。こうして

、光学顕微鏡が種々のレプリカのパターンに関する水性媒体中のインキュベーションの影響を分析するのに使用し得る。結果はエポキシレプリカがPBS中の1日のインキュベーションによりひどくかつ不可逆的に損傷されることを示した。PC及びPSレプリカはまた若干膨潤され、損傷された特徴を示すことがわかった。曇りがこれらの支持体中で消失した後でさえも、パターン化支持体への膨潤損傷の跡が残った。長期間にわたる乾燥空気中のインキュベーションは跡の強さ及び集団を減少することがわかったが、PC及びPSレプリカはまた水性媒体中のインキュベーションにより損傷されることが明らかであった。対照的に、これらの実験はPUのポリマーレプリカがPBS中のインキュベーションにより損傷されないことを実証した。それ故、AFM及び光学顕微鏡を使用する分析はポリウレタンが本発明の複製用途及び生物学的用途における使用に特に好ましいポリマーであることを示した。

【0044】

パターン化ポリマーレプリカの表面上の液晶の整列 (alignment)

支持体中の溝構造は液晶を溝の方向に一様に配列し得るので、液晶はパターン化表面の整列特性を調べるのに使用し得る。こうして、液晶をベースとする光学セルを使用してポリマーレプリカを調べた。最初に、液晶(5CB)のホメオトロピック固定を示す基準支持体を調製した。5CBのホメオトロピック固定は光学セルを通過した光の偏光を変化しない。こうして、レプリカのパターン化表面における5CBの固定を呈する光学組織が光学セル中の一つの支持体としての基準支持体及び他の支持体としてのポリマーレプリカを使用して観察し得る。5CBのホメオトロピック固定を示す支持体が上記のように一様に付着された金支持体上の長鎖アルカンチオール及び短鎖アルカンチオールの同時吸着により形成された混合自己集合単層(SAM)を使用して得られた。金支持体上の混合SAMを含む二つの支持体から調製された光学セルは5CBのホメオトロピック固定を示し、即ち、その光学外観は光学セルが回転されたか否かにかかわらず暗かった。この光学セル中の液晶のホメオトロピック固定はまたコノスコープ干渉により支持された。

【0045】

次にアルカンジオール及び金から調製された二つの支持体を含む光学セルの一

つの支持体をパターン化支持体又は非パターン化支持体で置換することにより光学セルを調製した。レプリカのパターン化表面上の5CBの固定から得られる光学組織がこうして観察され、記録し得る。ガラススライドを非パターン化支持体として使用し、こすられたガラススライドを初期にパターン化支持体として使用した。5CBはきれいなガラス支持体に非一様に固定されるが、布によるガラススライドの簡単なこすりはこすり方向（パターンの方向）の5CBの一様な整列をもたらす。こすられたガラススライドを使用して調製された光学セルから得られた光学組織は光学セルを回転した後に明暗の間の強い変調を示した。この結果はこすりの方向の5CBの一様な整列を実証する。対照的に、非パターン化支持体を光学セル中の支持体の一つとして使用した場合、光学外観は交差偏光子の間の光学セルの回転の関数として伝播される光の変調の欠如により証明されるように5CBの非一様な配向を示した。それ故、光学セル中の5CBのホメオトロピック固定を示す基準支持体の使用はパターン化ポリマー支持体上の液晶の整列を視覚化し、増幅するのに使用し得る。

【0046】

次に5CBをホメオトロピック固定した一つの基準支持体及びポリマーレプリカの一つである第二支持体を使用して、光学セルを調製した。全てのポリマー支持体について、パターン化領域中の5CBの固定は非パターン化領域中のそれとは差別し得る。ポリマーレプリカのパターン化領域はパターンの方向が偏光子と平行である場合に暗い像を生じた。更に、交差偏光子の間で光学セルを回転させると、明暗の間の強い変調を生じた。対照的に、レプリカの非パターン化領域中の光学組織は光学セルの回転後に光学的変調を殆ど示さなかった。

ポリマーレプリカを使用して調製された全ての光学セルの光学組織中の総合の特徴はパターン化方向に向かった5CBの固定を示したが、ポリマーレプリカ上の5CBの一様な整列の品質は使用されたポリマー材料に応じて異なった。夫々のポリマー材料について異なるレプリカを使用して少なくとも三つの光学セルを調製した。これらのセルの光学的特徴は夫々のポリマー材料について全く再現性であった。例えば、エポキシ及びPSレプリカはパターン化領域の全範囲にわたって5CBのきれいかつ一様な整列（一様かつ無特徴）を示した。一方、PUレプリカが

ら調製された光学セルはパターン化方向に向かった5CBの不十分な整列を誘導した（これらのセルの光学組織中で観察された流れパターンは5CBのわずかに異なる配向の同時存在を示す）。

【0047】

水性媒体中のインキュベーション後のポリマーレプリカ上の液晶の整列

PBS中のインキュベーション後のポリマーレプリカの表面に固定された液晶の光学的外観を試験した。5CBの一樣な整列の乱れはインキュベーション前の5CBの整列と比較してエポキシレプリカがPBS中で1時間インキュベートされた後にその中で観察された。PUレプリカの表面に固定された5CBの光学組織は完全な一樣の配向を示さなかった。何とならば、多くの流れパターンが組織中で観察されたからである。しかしながら、PBS中の1日のインキュベーションはPUレプリカの光学組織中の認められる変化を生じなかった。

【0048】

PCレプリカ上の5CBの固定からの光学組織はかなりの数の回位ループを示し、液晶のわずかに異なる配向を有するドメインの存在を示した。PCレプリカ上の液晶の光学組織の一樣性の減少はPBSの浸漬の前後の両方で観察され、広範囲の相違が水性媒体への暴露の前後に得られた光学組織の間で観察されなかった。先に検討したように、PBS中の1日のインキュベーションは顕微鏡により確認されたようにPC及びPSレプリカの表面を損傷した。PCレプリカから調製された光学セルに見られた非一樣な特徴は表面への損傷により説明し得るが、これはPBS中のインキュベーションにより変化されない5CBの完全な整列を示すPSレプリカから調製された光学セルの光学組織を説明しない。こうして、PC及びPSレプリカの両方が水性媒体中のインキュベーション後に曇って見えたが、PBS中のレプリカのインキュベーション後の5CBの光学組織の相違は光学顕微鏡を使用して得られた結果と一致する。こうして、PCレプリカはPSレプリカよりも水性媒体中の浸漬により極めてひどく損傷されると結論された。延長された期間にわたる水性媒体中のPSレプリカのインキュベーションはパターン化表面を損傷し得るが、PSレプリカは本発明における適用に非常に有益な支持体である。

【0049】

BSA被覆ポリマーレプリカ表面上の液晶の整列

先に注目されたように、PUレプリカは複製及び水溶液中の安定性に関して優れた性質を示した。しかしながら、PUレプリカのパターン化表面に固定された5CBの光学組織は流れパターンのような5CBの非一様な特徴を示した。液晶は小分子であり、表面上のその固定に基づいた表面特性を増幅するので、それはAFM又は光学顕微鏡を使用して検出されなかった表面特性についての情報を与える。

【0050】

PUレプリカの表面は非一様な液晶整列をもたらす構造を有するという仮定に基づいて、新しいアプローチを使用してPUレプリカ上の5CBの一様な整列を誘導した。こうして、ポリマーレプリカの表面における小生物分子の物理的吸着を調べてこれらが約200nmの幅及び約50nmの深さのパターン化表面の形態を消去しないで表面特性を変化させ、性能を改良するのに使用し得るか否かを測定した。こうして、上記のように調製されたポリマーレプリカをウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBS溶液中でインキュベートした。何とならば、BSAが殆どの表面に容易に吸着し、そのサイズはそれがポリマーレプリカ上のパターンを乱さないようなものであるからである。加えて、BSAフィルムはPDMSから調製された支持体表面上の5CBの平面固定を誘導する。吸着されたBSA層がPUレプリカで示された流れパターンを消去するのに十分にポリマーレプリカの表面を覆う場合、5CBの一様な整列が生じ、PUが本発明における支持体としての使用に優れた材料であることが仮定された。しかしながら、PUレプリカ中の5CBの光学的外観はBSAへの暴露の前に観察されたものと殆ど同じであった。こうして、吸着されたBSA層はPUレプリカ中で流れパターンを消去するのに有効な層として作用しない。直接対照的に、BSAを含むPBS溶液中でインキュベートされたPSレプリカで観察された5CBの一様な整列はこのポリマー支持体を小分子で被覆することがパターン化表面の形態を失わないで表面特性を変化させるのに簡単かつ有効な方法であることを実証する。

【0051】

上記操作を使用して、ポリウレタン及びポリスチレンのポリマーレプリカを金で被覆した。アルカンチオールから形成されたSAMをこれらの支持体の表面に形成した場合、本発明者らはそれらと接触して置かれた液晶が溝の方向に沿って一

様に固定されることを観察した。ポリウレタンレプリカ及びBSA被覆ポリウレタンレプリカは液晶の高度に一樣な整列を与えなかったが、金被覆はPU支持体上の液晶の一樣な整列をもたらす。

上記操作を使用して、SAMを金被覆ポリウレタン支持体上でパターン化した。ヘキサデカンはヘキサデカンチオールから形成されたSAMで官能化された金被覆ポリウレタン支持体を横切って広がらなかったが、パターンの存在がヘキサデカンチオール及び $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{OH}$ でパターン化された表面を横切ったヘキサデカンの液滴の広がりを観察することにより確認された。

ストレプトアビジンで被覆された2.8マイクロメートルの磁性ビーズを使用し、光学回折格子から成形されたポリマー支持体を使用して検出を行なった。上記操作を使用して、ポリマーレプリカをビオチニル化BSAで被覆した。PBS中に懸濁されたビーズをビオチニル化BSA被覆支持体の表面に分配した。次いで磁石を支持体の下に置いてビーズを支持体の被覆表面に向かって引き込んだ。5分後に、磁石を除去し、表面をすすいだ。表面上のビーズの存在を光学顕微鏡により確認した。液晶は結合ビーズの不在で溝に沿って一樣に配列されたが、結合ビーズの存在は液晶の一樣な整列の乱れをもたらす。

【0052】

ポリマーレプリカのパターン化

金被覆ポリウレタンレプリカを約1mMの濃度のヘキサデカンチオールのエタノール溶液中に浸漬することによりそれらを疎水性にする。それを平らなポリスチレン表面に対し成形することにより形成された平らな表面を有するPDMSスタンプを約30分間にわたって約10mg/mlの濃度のBSAの水溶液中に浸漬することによりポリスチレン表面をBSAでインキ塗りする。スタンプの表面をPBS次いで水ですすぎ、その後にそれを窒素ガスの流れの下で乾燥させる。次いでスタンプの表面を約1秒間にわたって疎水性レプリカの表面と接触させてBSAをレプリカの溝のリッジの上部に転写する。次いで全レプリカを約50 µg/mlの濃度の抗VSVインジアナの水溶液中に10分間浸漬し、その結果、抗VSVインジアナ免疫グロブリンがレプリカのくぼみ又は溝に吸着される。この様式において、結合剤の実質的に全てがレプリカの検出領域のくぼみ中に見られる。レプリカを約 10^6 pfu/mlの濃度のVSV

のインジアナ株を含む水性サンプルに浸漬することはレプリカの溝中のVSVの結合をもたらし、溝中の液晶の固定を乱す。

本発明は説明のために上記された実施態様に限定されないが、特許請求の範囲内に入るようなその全てのこのような形態を包含することが理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の検出領域を有する検出装置の簡素化平面図である。

【図2】

本発明の検出装置の簡素化断面図である。

【図3】

特定病原体に結合するための結合剤をその中に含むブロッキング層を有する検出装置の支持体を示す略断面図である。

【図4】

検出領域の相対位置を示す支持体の略図である。

【図5】

ウイルスが存在しない支持体の表面上にブロッキング分子及び結合剤分子を含むブロッキング層を示す略図である。

【図6】

支持体への特定ウイルスの結合を示す図6の略図と同様の略図である。

【図7】

支持体の表面上の結合剤に結合されないウイルス粒子の存在を示す図6の略図と同様の略図である。

【図8】

夫々が異なる特定病原体を結合する検出領域のアレイを有する検出装置の簡素化斜視図である。

【図9】

シリコンマスターを使用してPDMSマスターを形成し、次いでこれを使用してポリマー支持体を形成する検出装置用のポリマー支持体の形成方法を示す略図である。

【図10】

PDMSレプリカを形成するのに使用されたシリコンマスターのAFM像の三次元プロットである。

【図11】

シリコンマスターから形成されたPDMSレプリカのAFM像の三次元プロットである。

【図12】

エポキシドレプリカが水溶液に浸漬される前のPDMSレプリカから形成されたエポキシドレプリカのAFM像の三次元プロットである。

【図13】

ポリウレタンレプリカが水溶液に浸漬される前のPDMSレプリカから形成されたポリウレタンレプリカのAFM像の三次元プロットである。

【図14】

ポリシアノアクリレートレプリカが水溶液に浸漬される前のPDMSレプリカから形成されたポリシアノアクリレートレプリカのAFM像の三次元プロットである。

【図15】

ポリスチレンレプリカが水溶液に浸漬される前のPDMSレプリカから形成されたポリスチレンレプリカのAFM像の三次元プロットである。

【図16】

エポキシドレプリカがPBS水溶液に1時間浸漬された後のPDMSレプリカから形成されたエポキシドレプリカのAFM像の三次元プロットである。

【図17】

ポリウレタンレプリカがPBS水溶液に1日浸漬された後のPDMSレプリカから形成されたポリウレタンレプリカのAFM像の三次元プロットである。

【図18】

ポリシアノアクリレートレプリカがPBS水溶液に1日浸漬された後のPDMSレプリカから形成されたポリシアノアクリレートレプリカのAFM像の三次元プロットである。

【図19】

ポリスチレンレプリカがPBS水溶液に1日浸漬された後のPDMSレプリカから形成されたポリスチレンレプリカのAFM像の三次元プロットである。

【図1】

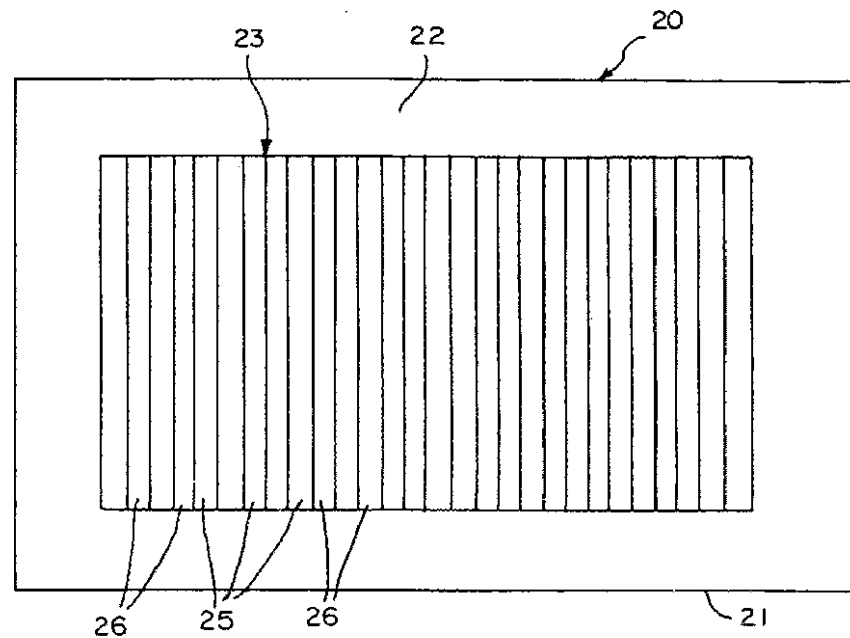


FIG. 1

【図2】

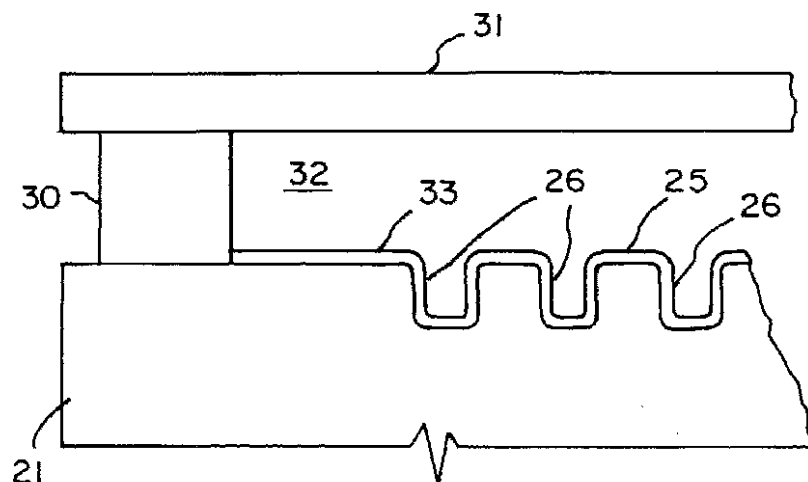


FIG. 2

【図3】

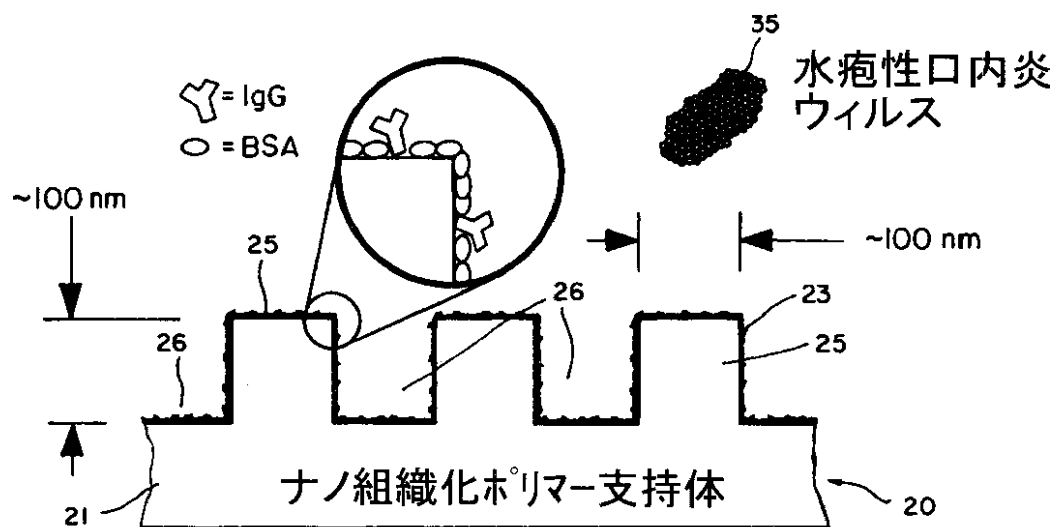


FIG. 3

【図4】

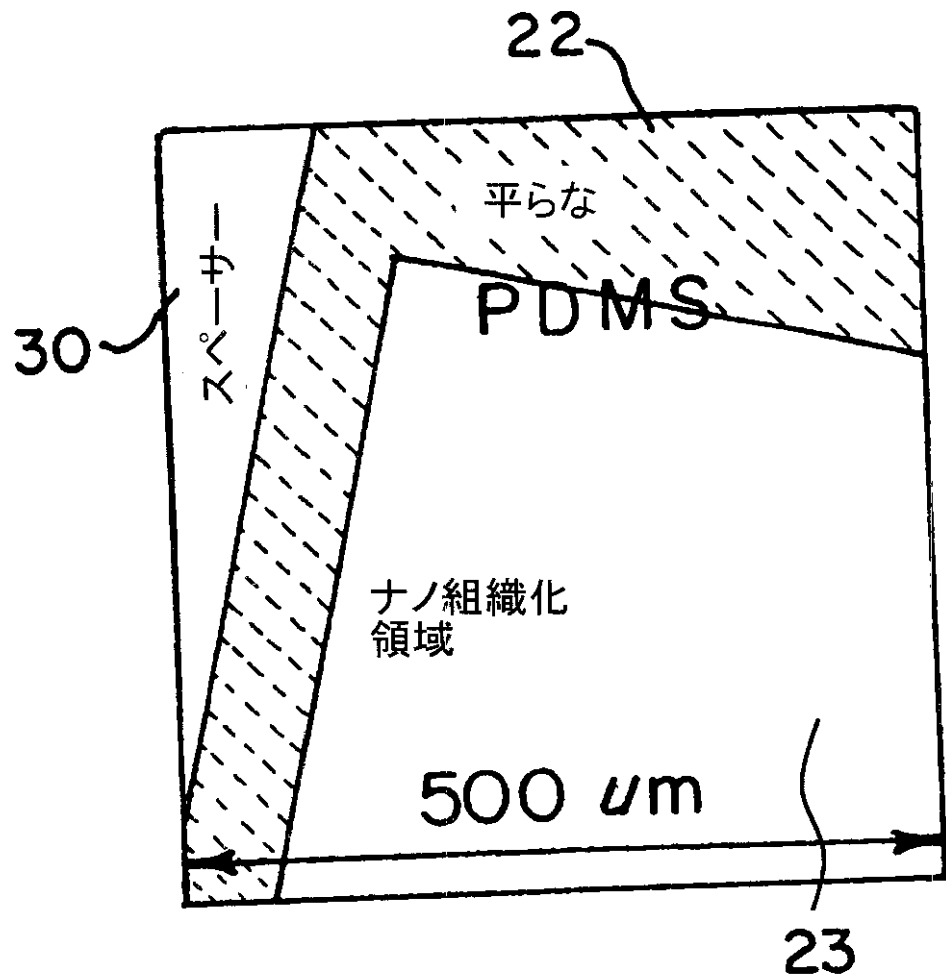


FIG. 4

【図5】

VSV-1に関するIgG

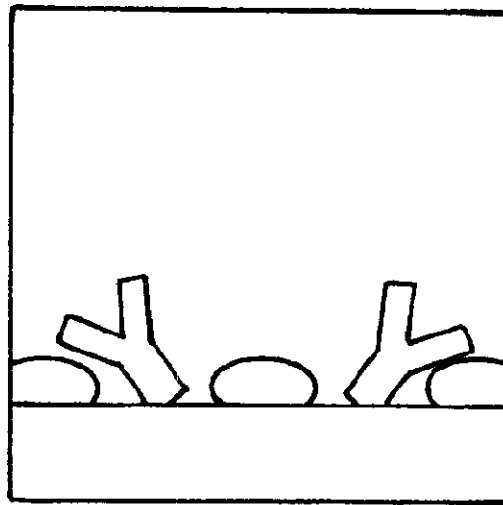


FIG. 5

【図6】

IgG + VSV-1

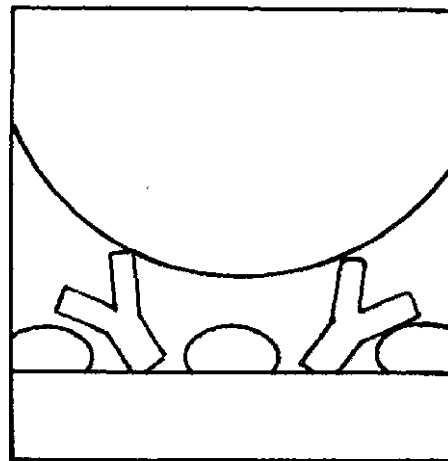


FIG. 6

【図7】

(対照)
IgG + VSV-NJ

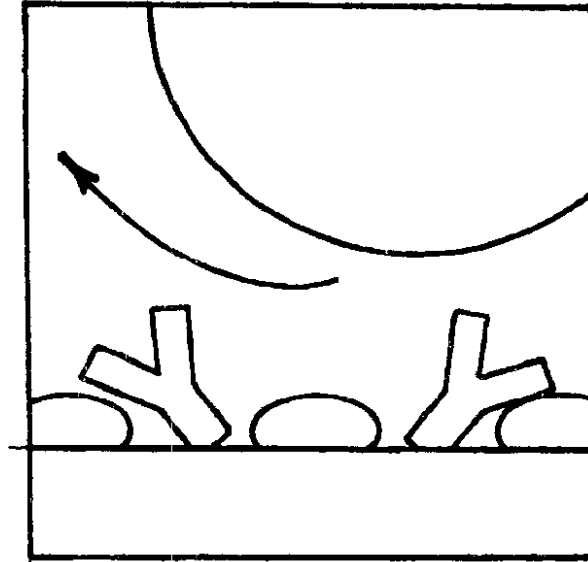


FIG. 7

【図8】

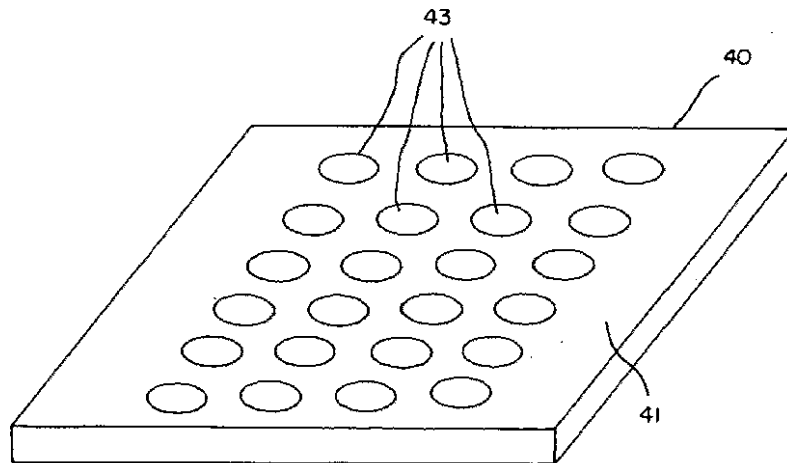


FIG. 8

【図9】

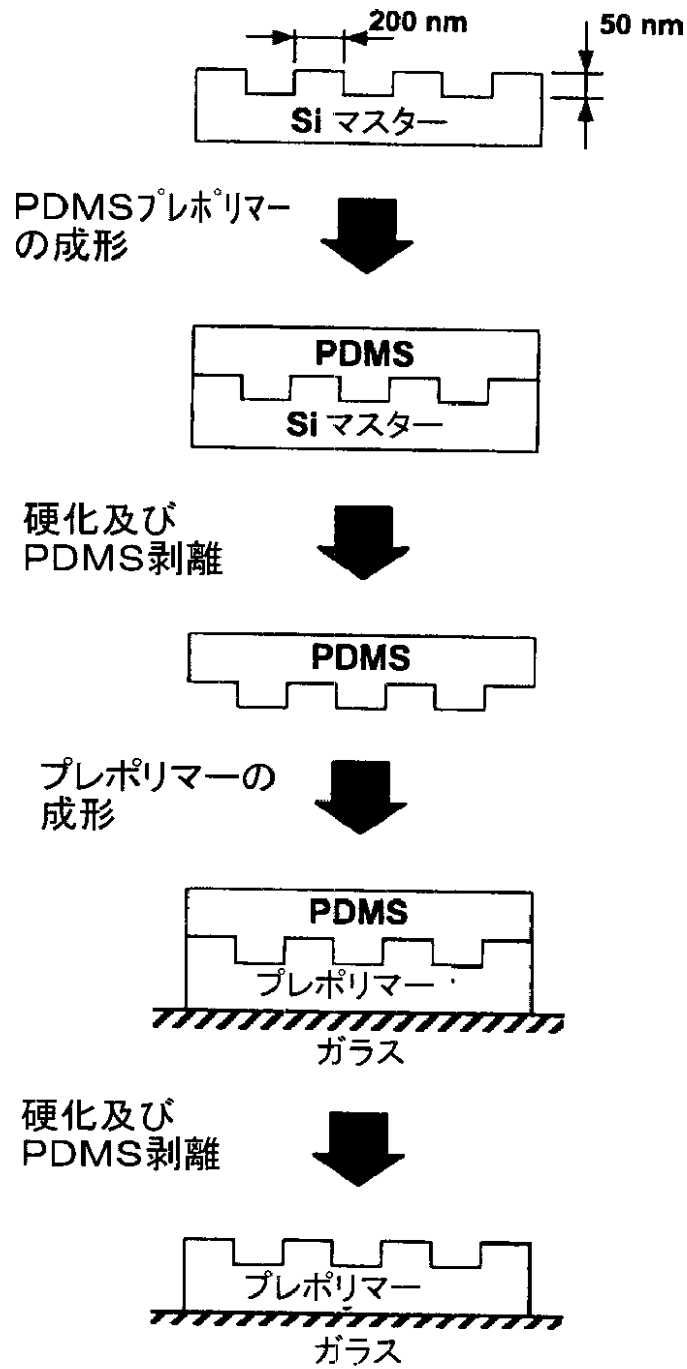


FIG. 9

【図10】

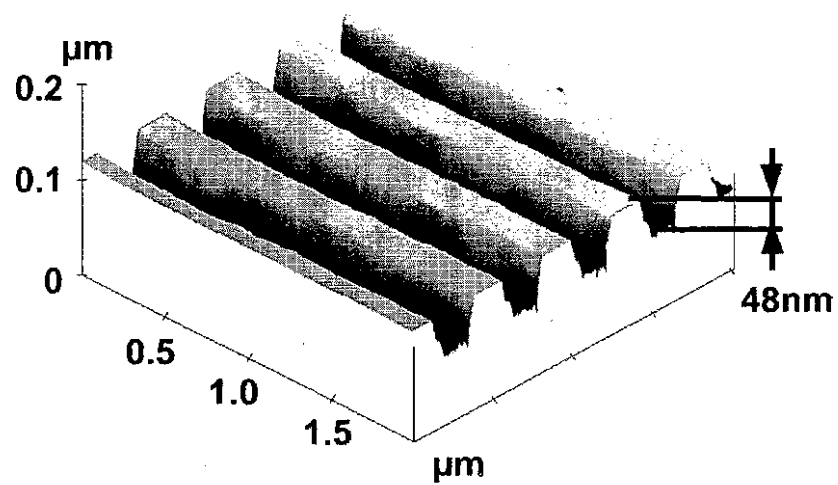


FIG. 10

【図11】

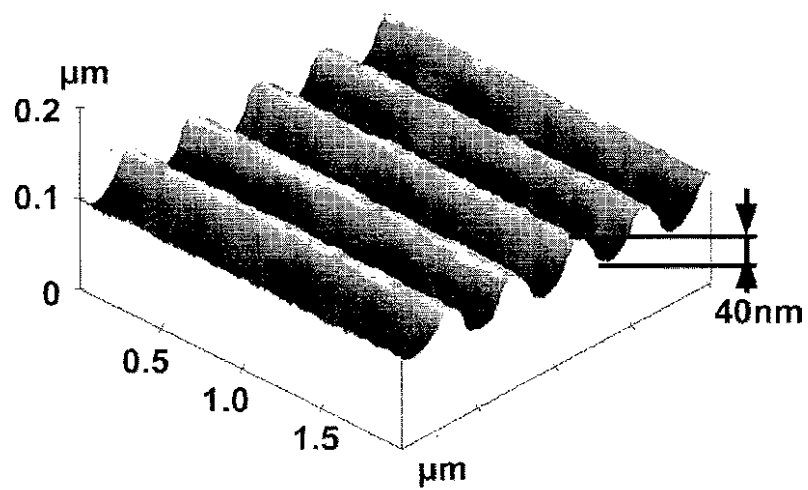


FIG. 11

【図12】

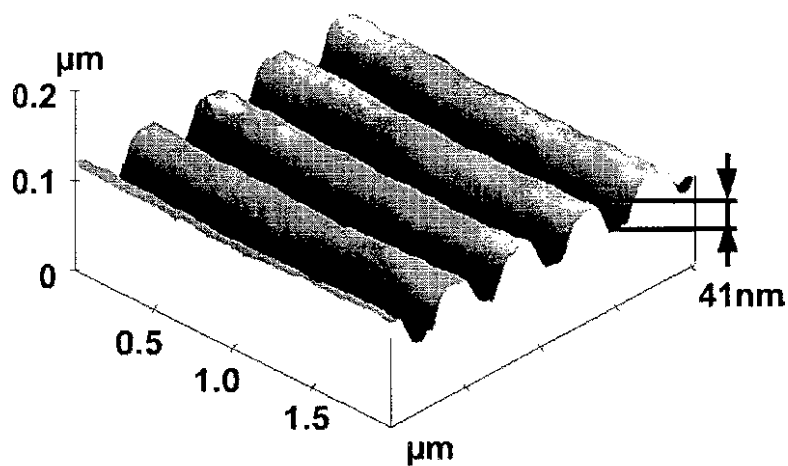


FIG. 12

【図13】

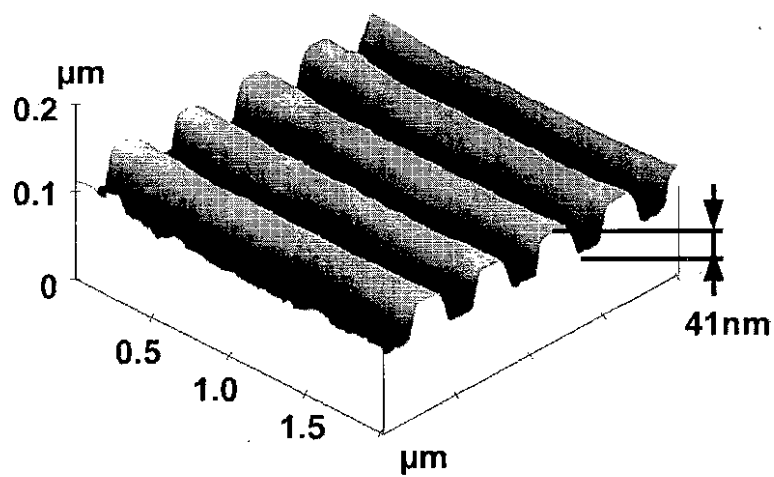


FIG. 13

【図14】

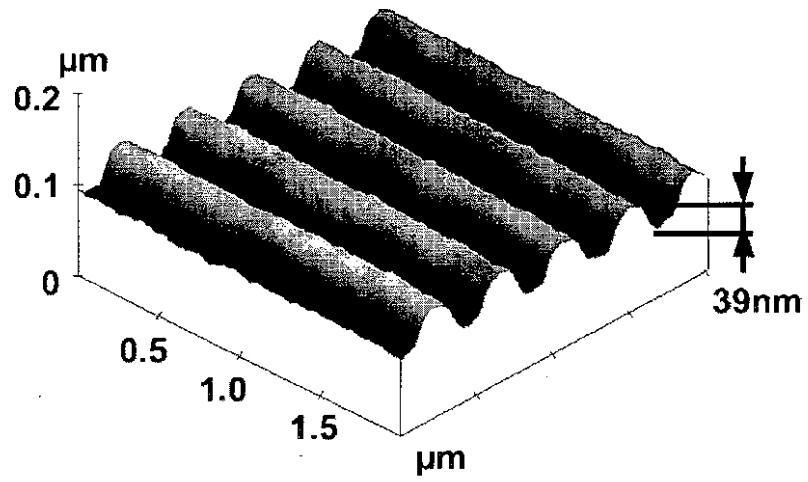


FIG. 14

【図15】

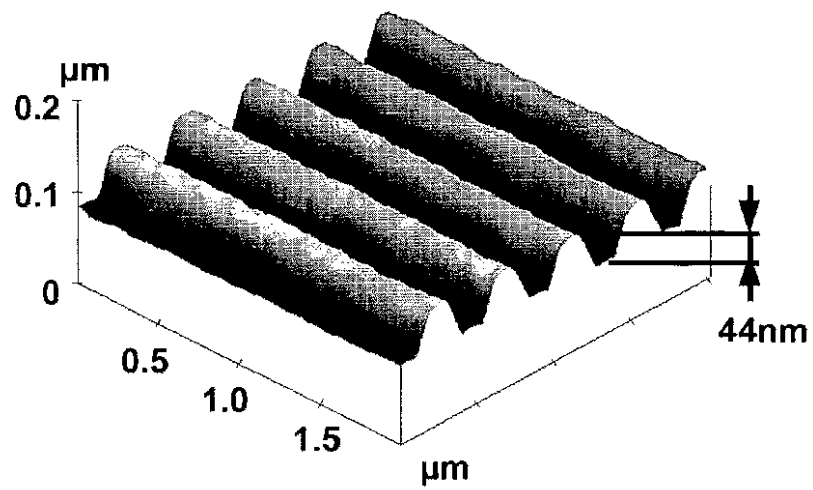


FIG. 15

【図16】

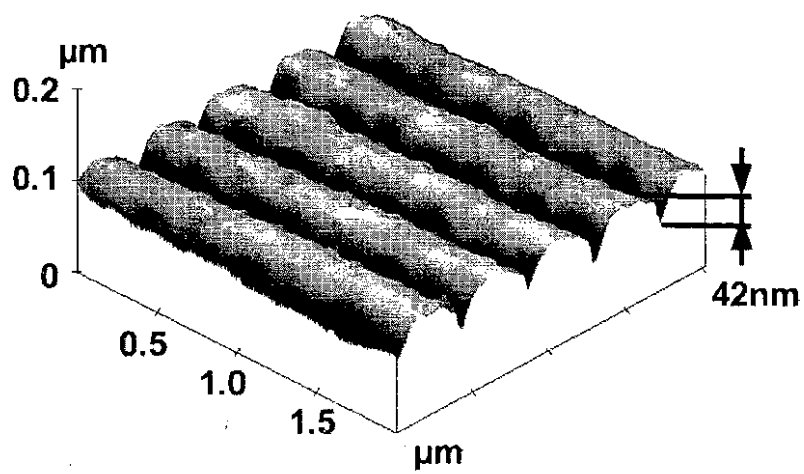


FIG. 16

【図17】

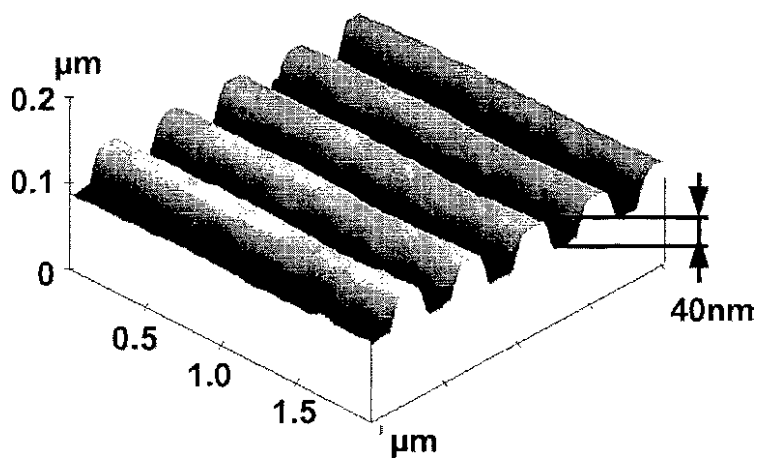


FIG. 17

【図18】

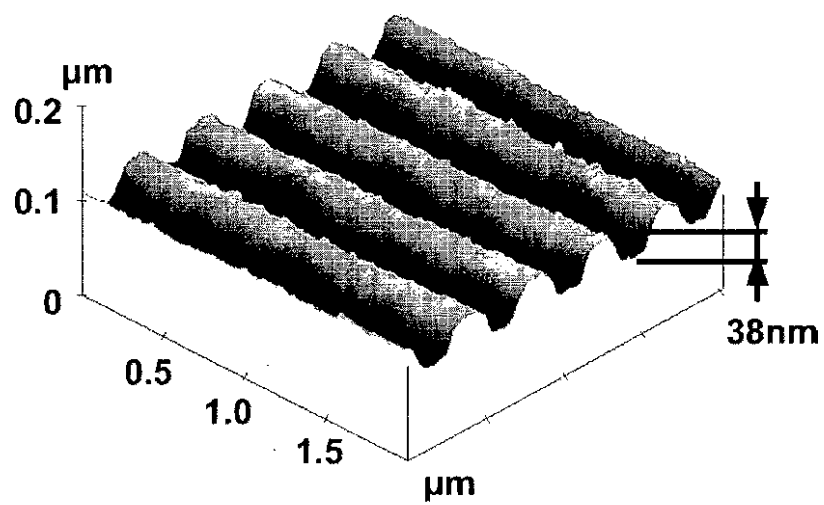


FIG. 18

【図19】

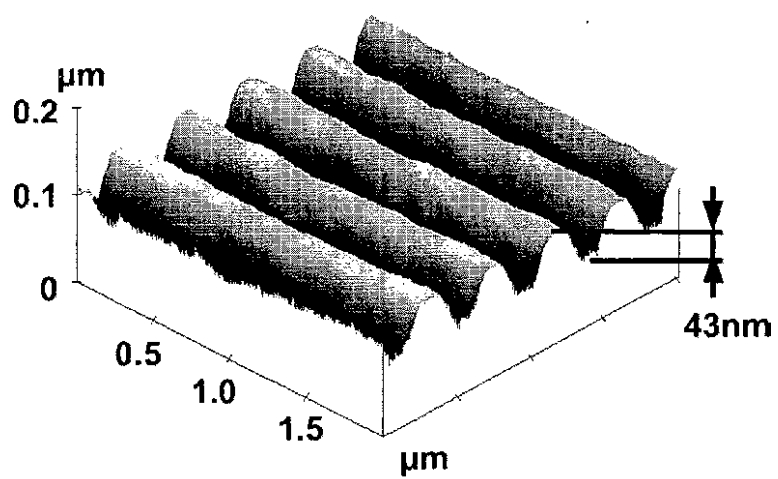


FIG. 19

【手続補正書】

【提出日】平成15年1月28日(2003.1.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中の選択された顕微鏡的病原体の存在の検出用の方法であって、以下の工程、

(a) 検出領域をその上に有する支持体を用意する工程であって、前記支持体が、表面を有し、該表面が、液晶材料を接触して配列するサイズの幅及び深さのくぼみを含む微小構造を含み、前記くぼみが、選択された病原体により占有されるのに十分なサイズのものであり、前記検出領域の表面が、表面への病原体の非特異的結合をブロックするように処理され、かつ検出すべき選択された病原体と特異的に結合する結合剤をその上に有する工程、

(b) 特定病原体の存在について試験すべきサンプルを前記支持体の検出領域の表面に適用する工程、そして

(c) その後に、前記支持体の表面への前記病原体の粒子の結合の不在下で、前記支持体の表面上の微小構造により整列される前記検出領域に、前記液晶材料を適用する工程であって、それによりサンプル中の前記選択された病原体の存在がくぼみ中で前記支持体に結合された前記病原体粒子により生じた前記液晶材料の目視観察できる不規則化により顕在化される工程、有することを特徴とする方法。

【請求項2】 サンプル中の選択された病原体の存在の検出用の検出装置であって、

表面に検出領域を有する支持体であって、該検出領域が、その中に形成された溝を含む微小構造を有し、該溝が、それと接触して液晶材料を配列し、該溝の幅及び深さが、10 μ m以下の範囲である支持体、

該支持体の前記検出領域の表面上のブロッキング層であって、それと接触する液晶材料の整合を乱さず、前記表面への病原体の非特異的吸着をブロックするブロッキング層、及び

前記支持体の該検出領域の表面上の結合剤であって、選択された病原体を特異的に結合する結合剤、
を含むことを特徴とする検出装置。

【請求項3】 サンプル中の選択された病原体の存在の検出用のキットであって、

(a)以下の要素、

(i)表面上に検出領域を有する支持体であって、該検出領域がその中に形成された溝を含む微小構造を有し、該溝と接触して液晶材料を配列する溝の幅及び深さが10 μm 以下の範囲である支持体、

(ii) 前記支持体の前記検出領域の表面上のブロッキング層であって、それと接触する液晶材料の整合を乱さず、かつその表面への病原体の非特異的吸着をブロックするブロッキング層、及び

(iii)前記支持体の前記検出領域の表面に付着した結合剤であって、選択された病原体と特異的に結合する結合剤、
を有する支持体、並びに

(b)前記検出領域に結合される病原体の不在下で、前記支持体の該検出領域と接触する場合に配列される液晶材料、
を含むことを特徴とする検出用のキット。

。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

ポリマーレプリカのパターン化

金被覆ポリウレタンレプリカを約1mMの濃度のヘキサデカンチオールのエタノール溶液中に浸漬することによりそれらを疎水性にする。それを平らなポリスチレン表面に対し成形することにより形成された平らな表面を有するPDMSスタンプを約30分間にわたって約10mg/mlの濃度のBSAの水溶液中に浸漬することによりポリスチレン表面をBSAでインキ塗りする。スタンプの表面をPBS次いで水ですすぎ、その後にそれを窒素ガスの流れの下で乾燥させる。次いでスタンプの表面を約1秒間にわたって疎水性レプリカの表面と接触させてBSAをレプリカの溝のリッジの上部に転写する。次いで全レプリカを約50 µg/mlの濃度の抗VSVインジアナの水溶液中に10分間浸漬し、その結果、抗VSVインジアナ免疫グロブリンがレプリカのくぼみ又は溝に吸着される。この様式において、結合剤の実質的に全てがレプリカの検出領域のくぼみ中に見られる。レプリカを約 10^6 pfu/mlの濃度のVSVのインジアナ株を含む水性サンプルに浸漬することはレプリカの溝中のVSVの結合をもたらし、溝中の液晶の固定を乱す。

本発明の具体的な態様を以下に示す。

1．サンプル中の選択された顕微鏡的病原体の存在の検出用の方法であって、以下の工程、

(a) 検出領域をその上に有する支持体を用意する工程であって、該支持体が、表面を有し、該表面が、液晶材料を接触して配列するサイズの幅及び深さのくぼみを含む微小構造を含み、前記くぼみが、選択された病原体により占有されるのに十分なサイズのものである工程、そして

(b) 前記検出領域の表面を処理して、前記表面への病原体の非特異的結合をブロックし、かつ検出すべき前記選択された病原体と特異的に結合する結合剤を含む層をその上に提供する工程、
を有することを特徴とする方法。

2．特定病原体の存在について試験すべきサンプルを前記支持体の検出領域の表面に適用し、その後に、前記支持体の表面への病原体粒子の結合の不在下で、該支持体の表面上の微小構造により配列される検出領域に、前記液晶材料を適用することを更に含み、それによりサンプル中の選択された病原体の存在が支持体に結合された病原体粒子により生じた液晶材料の目視観察できる不規則化により顕

在化される上記1項記載の方法。

3．前記検出領域の表面の処理が、ウシ血清アルブミンを前記支持体の検出領域の表面に適用することを含む上記1項記載の方法。

4．前記検出領域の表面の処理が、免疫グロブリン又はその部分を選択された病原体に特異的な結合部位を与える検出領域表面に適用することを含む上記3項記載の方法。

5．磁性ビーズを特定病原体の存在について試験すべきサンプルと接触させ、その後に磁性ビーズを支持体の検出領域の表面と接触させ、その後に液晶材料を検出領域に適用することを更に含み、くぼみが病原体と接触した後に磁性ビーズにより占有されるのに十分なサイズのものであり、それによりサンプル中の選択された病原体の存在が液晶材料の目視観察できる不規則化により顕在化される上記1項記載の方法。

6．前記磁性ビーズが、試験すべき病原体と特異的に結合する結合剤を含む表面を有する上記5項記載の方法。

7．サンプル中の選択された顕微鏡的病原体の存在の検出用の方法であって、以下の工程、

(a) 検出領域をその上に有する支持体を用意する工程であって、前記支持体が、表面を有し、該表面が、液晶材料を接触して配列するサイズの幅及び深さのくぼみを含む微小構造を含み、前記くぼみが、選択された病原体により占有されるのに十分なサイズのものであり、前記検出領域の表面が、表面への病原体の非特異的結合をブロックするように処理され、かつ検出すべき選択された病原体と特異的に結合する結合剤をその上に有する工程、

(b) 特定病原体の存在について試験すべきサンプルを前記支持体の検出領域の表面に適用する工程、そして

(c) その後に、前記支持体の表面への前記病原体の粒子の結合の不在下で、前記支持体の表面上の微小構造により整列される前記検出領域に、前記液晶材料を適用する工程であって、それによりサンプル中の前記選択された病原体の存在がくぼみ中で前記支持体に結合された前記病原体粒子により生じた前記液晶材料の目視観察できる不規則化により顕在化される工程、

有することを特徴とする方法。

8．前記検出領域の表面が、病原体の非特異的結合をブロックするためのウシ血清アルブミンの層を表面上に含む上記7項記載の方法。

9．前記検出領域の表面が、前記選択された病原体に特異的な結合部位を与える免疫グロブリン又はその部分を前記検出領域表面上に含む上記7項記載の方法。

10．前記検出領域の少なくとも一部をケイ素の酸化物、金属の酸化物、金属、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれた無機材料で被覆することを更に含む上記1項又は7項記載の方法。

11．前記無機材料が、銀又は金であり、銀又は金の少なくとも一部をメルカプタン又はジスルフィドで処理することを更に含む上記10項記載の方法。

12．前記支持体が、成形ポリマープラスチックから形成される上記1項又は7項記載の方法。

13．前記成形ポリマープラスチックが、ポリスチレン、ポリシアノアクリレート、又はポリウレタンを含む上記12項記載の方法。

14．前記成形ポリマーが、ポリジメチルシロキサンである上記12項記載の方法。

15．前記選択された病原体が、ウイルスであり、前記検出領域の表面上のくぼみが、5nm～500nmの範囲の幅及び深さを有する上記1項又は7項記載の方法。

16．前記支持体の検出領域の表面上のくぼみが、約100nmの幅を有する平行な溝を含む上記1項又は7項記載の方法。

17．前記溝が、約100nmの幅を有するリッジにより分離される上記16項記載の方法。

18．前記溝が、約100nmの深さを有する上記16項記載の方法。

19．前記結合剤が、ペプチド、ポリペプチド、RNA、DNA、ビオチン、アビジン、抗体のフラグメント、抗体、及び糖からなる群から選ばれる上記1項又は7項記載の方法。

20．前記選択された病原体が、細菌であり、前記検出領域の表面上のくぼみが、0.1 μ m～10 μ mの範囲の幅及び深さを有する上記1項又は7項記載の方法。

21．実質的に全ての結合剤が検出領域のくぼみに配置される上記1項又は7項

記載の方法。

22．サンプル中の選択された病原体の存在の検出用の検出装置であって、

表面に検出領域を有する支持体であって、該検出領域が、その中に形成された溝を含む微小構造を有し、該溝が、それと接触して液晶材料を配列し、該溝の幅及び深さが、10 μ m以下の範囲である支持体、

該支持体の前記検出領域の表面上のブロッキング層であって、それと接触する液晶材料の整合を乱さず、前記表面への病原体の非特異的吸着をブロックするブロッキング層、及び

前記支持体の該検出領域の表面上の結合剤であって、選択された病原体を特異的に結合する結合剤、を含むことを特徴とする検出装置。

23．前記選択された病原体が、ウイルスであり、前記溝の幅及び深さが、5nm～500nmの範囲である上記22項記載の検出装置。

24．前記溝が、100nm以下の程度の幅を有するリッジにより分離される上記23項記載の検出装置。

25．前記検出領域の少なくとも一部が、ケイ素の酸化物、金属の酸化物、金属、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれた無機材料で被覆される上記22項記載の検出装置。

26．前記無機材料が、銀又は金であり、銀被覆領域又は金被覆領域の少なくとも一部が、メルカプタン又はジスルフィドとの金又は銀の反応生成物を含む上記25項記載の検出装置。

27．前記支持体が、ポリマープラスチックから形成される上記22項記載の検出装置。

28．前記ポリマープラスチックが、ポリスチレン、ポリシアノアクリレート、又はポリウレタンを含む上記27項記載の検出装置。

29．前記ブロッキング層が、ウシ血清アルブミンから形成される上記22項記載の検出装置。

30．前記結合剤が、選択された病原体と特異的に結合する免疫グロブリン又はその部分を含む上記22項記載の検出装置。

31．前記結合剤が、ペプチド、ポリペプチド、RNA、DNA、ビオチン、アビジン、抗体のフラグメント、抗体、及び糖からなる群から選ばれる上記22項記載の検出装置。

32．前記選択された病原体が、細菌であり、前記溝の幅及び深さが、 $0.1\mu\text{m}$ ～ $10\mu\text{m}$ の範囲である上記22項記載の検出装置。

33．前記支持体が、ポリジメチルシロキサンから形成される上記22項記載の検出装置。

34．前記支持体が、該支持体の表面上のアレイ中に多くの検出領域を有し、該検出領域の夫々が、異なる特定病原体と結合する結合剤をその上に有する上記22項記載の検出装置。

35．前記検出領域が、第一検出領域であり、前記支持体が、該支持体の表面上に少なくとも第二検出領域を更に含み、該支持体の少なくとも第二検出領域が、接触して液晶材料を配列する幅及び深さを有するその中に形成された溝を含む微小構造を有し、少なくとも第二検出領域中の溝の幅が第一検出領域中の溝の幅とは異なり、少なくとも第二検出領域中の溝の深さが第一検出領域中の溝の深さとは異なり、又は少なくとも第二検出領域中の溝の幅及び深さの両方が第一検出領域中の溝の幅及び深さとは異なる上記22項記載の検出装置。

36．実質的に全ての前記結合剤が、前記検出領域の溝中に配置される上記22項記載の検出装置。

37．サンプル中の選択された病原体の存在の検出用のキットであって、

(a)以下の要素、

(i)表面上に検出領域を有する支持体であって、該検出領域がその中に形成された溝を含む微小構造を有し、該溝と接触して液晶材料を配列する溝の幅及び深さが $10\mu\text{m}$ 以下の範囲である支持体、

(ii) 前記支持体の前記検出領域の表面上のブロッキング層であって、それと接触する液晶材料の整合を乱さず、かつその表面への病原体の非特異的吸着をブロックするブロッキング層、及び

(iii) 前記支持体の前記検出領域の表面に付着した結合剤であって、選択された病原体と特異的に結合する結合剤、

を有する支持体、並びに

(b)前記検出領域に結合される病原体の不在下で、前記支持体の該検出領域と接触する場合に配列される液晶材料、を含むことを特徴とする検出用のキット。

38．前記選択された病原体が、ウイルスであり、前記溝の幅及び深さが、5nm～500nmの範囲である上記37項記載のキット。

39．前記溝が、100nm以下の程度の幅を有するリッジにより分離される上記38項記載のキット。

40．前記検出領域の少なくとも一部が、ケイ素の酸化物、金属の酸化物、金属、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれた無機材料で被覆される上記37項記載のキット。

41．前記無機材料が、金又は銀であり、銀被覆領域又は金被覆領域の少なくとも一部がメルカプタン又はジスルフィドとの金又は銀の反応生成物を含む上記40項記載のキット。

42．前記支持体が、ポリマープラスチックから形成される上記37項記載のキット。

43．前記ポリマープラスチックが、ポリスチレン、ポリシアノアクリレート、又はポリウレタンを含む上記42項記載のキット。

44．前記ブロッキング層が、ウシ血清アルブミンから形成される上記37項記載のキット。

45．前記結合剤が、選択された病原体と特異的に結合する免疫グロブリン又はその部分を含む上記37項記載のキット。

46．前記結合剤が、ペプチド、ポリペプチド、RNA、DNA、ビオチン、アビジン、抗体のフラグメント、抗体、及び糖からなる群から選ばれる上記37項記載のキット。

47．前記選択された病原体が、細菌であり、溝の幅及び深さが0.1 μ m～10 μ mの範囲である上記37項記載のキット。

48．前記支持体が、その中に成形された溝を有するポリジメチルシロキサンから形成される上記37項記載のキット。

49．前記液晶材料が、4-シアノ-4'-ペンチルビフェニルネマチック液晶である上記37項記載のキット。

50．前記支持体が、該支持体の表面上のアレイ中に多くの検出領域を有し、前記検出領域の夫々が、異なる特定病原体を結合する結合剤をその上に有する上記37項記載のキット。

51．前記検出領域が、第一検出領域であり、前記支持体が、該支持体の表面上に少なくとも第二検出領域を更に含み、該支持体の少なくとも第二検出領域が、接触して液晶材料を配列する幅及び深さを有するその中に形成された溝を含む微小構造を有し、少なくとも第二検出領域中の溝の幅が、第一検出領域中の溝の幅とは異なり、少なくとも第二検出領域中の溝の深さが、第一検出領域中の溝の深さとは異なり、又は少なくとも第二検出領域中の溝の幅及び深さの両方が、第一検出領域中の溝の幅及び深さとは異なる上記37項記載のキット。

52．実質的に全ての結合剤が、前記検出領域の溝中に配置される上記37項記載のキット。

53．前記検出領域の溝にフィットするのに十分なサイズの磁性ビーズを更に含む上記37項記載のキット。

54．前記磁性ビーズが、表面を含み、該磁性ビーズの表面が、前記選択された病原体と結合する結合剤を含む上記53項記載のキット。

本発明は、説明のために上記された実施態様に限定されないが、特許請求の範囲内に入るようなその全てのこのような形態を包含することが理解される。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/04858
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 345 462 A (ABBOTT LAB) 13 December 1989 (1989-12-13) claims	1-54

I. INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 01/04858

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9963329	A	09-12-1999	US 6284197 B1	04-09-2001
			EP 1084394 A1	21-03-2001
			WO 9963329 A1	09-12-1999
WO 9208978	A	29-05-1992	AU 8944291 A	11-06-1992
			WO 9208978 A1	29-05-1992
EP 0345462	A	13-12-1989	US 4983529 A	08-01-1991
			CA 1340109 A1	03-11-1998
			DE 68922243 D1	24-05-1995
			DE 68922243 T2	26-10-1995
			EP 0345462 A2	13-12-1989
			ES 2074062 T3	01-09-1995
			JP 2032261 A	02-02-1990
			JP 2905218 B2	14-06-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/543	5 4 1	G 0 1 N 33/543	5 2 5 W
33/545		33/545	5 4 1 A
33/552		33/552	Z
33/553		33/553	
33/566		33/566	
(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(72)発明者	スカイフェ ジャスティン ジェイ		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州		
	94549 ラファイエット シルヴァーウッ		
	ド ドライヴ 55		

专利名称(译)	用于检测微观病原体的方法和设备		
公开(公告)号	JP2003523518A	公开(公告)日	2003-08-05
申请号	JP2001560694	申请日	2001-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	威斯康星校友研究基金会		
申请(专利权)人(译)	威斯康星Aramuni研究基金会		
[标]发明人	アボットニコラスエル スカイフェジャスティンジェイ		
发明人	アボット ニコラス エル スカイフェ ジャスティン ジェイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/552 G01N33/553 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	B82Y30/00 G01N33/54373 G01N33/569 G01N33/56911 Y10S436/807		
FI分类号	G01N33/569.B G01N33/569.G G01N33/53.U G01N33/543.501.J G01N33/543.525.E G01N33/543.525.W G01N33/543.541.A G01N33/545.Z G01N33/552 G01N33/553 G01N33/566		
优先权	60/182941 2000-02-16 US		
其他公开文献	JP3886382B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种用于检测样品中所选病原体的存在的检测装置。这种装置具有在其表面上具有检测区域的支撑物（该检测区域具有微结构，该微结构包括在其中形成的沟槽，在该沟槽中布置有与其接触的液晶，沟槽的宽度和深度为支撑物的检测区域表面上的阻挡层，该阻挡层不干扰与其接触的液晶材料的取向（该阻挡层阻挡病原体向该表面的非特异性吸附）并且在支撑物的检测区域的表面上的结合剂，该结合剂特异性结合选择的病原体。

