

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
G01N 33/53

(11) 공개번호 특1999-0063211  
(43) 공개일자 1999년07월26일

(21) 출원번호	10-1998-0056247
(22) 출원일자	1998년12월18일
(30) 우선권주장	197 57 980.9 1997년12월24일 독일(DE) 198 16 550.1 1998년04월15일 독일(DE)
(71) 출원인	로세 디아그노스틱스 게엠베하 독일연방공화국(68305) 만하임 잔트호퍼 스트랏세 116
(72) 발명자	피셔 토마스 독일 데-69231 라우엔베르트 핀켄베크 4 회쉬 마티나 독일 데-68163 만하임 프란츠-콘라트-링크-슈트라세 1 피셔 울리케 독일 데-82377 펜츠베르크 파울-뢰베-슈트라세 15 니히틀 알폰스 독일 데-82383 호엔파이센베르크 츠바이크슈트라세1베 힐러 게르하르트 독일 데-68305 만하임 글뤽스부르거 벡 236 클레프 위르겐 독일 데-76131 칼스루에 루드비히-빌헬름-슈트라세 11
(74) 대리인	김윤배, 이윤민

**심사청구 : 없음**

**(54) 분석용 구성물의 다목적 구조 및 분석물질측정을 위한 이의 적용**

**요약**

본 발명은 샘플 적용 구역과 검출 구역 사이에 액체 이동을 가능하게 하는 물질 내에 또는 물질 상에 샘플 적용 구역과 검출 구역을 함유한, 분석물질 (analyte) 의 측정을 위한 분석용 구성물 (analytical element) 및, 이러한 분석용 구성물을 이용한 분석물질의 측정 방법에 관한 것이다. 여기서, 검출 구역은 접촉시에 분석물질이 아닌 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와 결합할 수 있는 방법으로 고정된 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 을 함유하고, 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 은 액체에 의해 이동될 수 있도록 물질 상에 함침된 검출 구역의 상류에 존재하여, 접촉시에 분석물질이 아닌 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 에 결합할 수 있다.

**대표도**

**도1**

**명세서**

**도면의 간단한 설명**

도 1 은 하기를 포함하는, 본 발명에 따른 다목적 분석용 구성물을 나타낸다 : 담체 박막 (6); 용리제 적용 구역 (4); 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 을 함유한 구역 (3); 샘플 적용 구역 (1); 검출 구역 (2) (특이적 결합 페어 1 의 고정화된 파트너 1 을 함유한 무색 검출선 (7) 및, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 1 에 대한 항체를 함유한 무색 대조선 (8) 함유); 그리고, 액체 집합 구역 (5). 이 구역들은 담체 박막 (6) 상에 실질적으로 하나의 평면으로 서로 이웃하여 배열되어 있다. 여기서, 서로 이웃하여 란, 액체 이동 방향으로 각각 바로 앞 구역에 약간 겹쳐져 하나의 구역에서 다른 구역으로의 액체 이동을 가능하도록 배열되는 것을 포함한다.

도 2 에 나타낸 본 발명에 따른 분석용 구성물은 완전히 집적된 분석용 구성물이다. 즉, 분석물질 측정을 수행하는 데에 필요한 모든 시약들을 함유한 것이다. 이는 완전 혈액을 검사하는 데에도 적합하다. 하기의 것들이 담체 박막 (6) 상에 서로 이웃하여 배열된다 : 샘플 적용 구역 (1); 특이적 결합 페어 1 및 2 의 파트너 2 들을 함유한 구역 (9); 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 을 함유한 구

역 (3); 혈장 또는 혈청 분리 구역 (10); 검출 구역 (2) (특이적 결합 페어 1 의 고정화된 파트너 1 을 함유한 무색 검출선 (7) 및, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 1 에 대한 항체를 함유한 무색 대조선 (8) 함유); 그리고, 액체 집합 구역 (5).

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 샘플 적용 구역과 검출 구역 사이에 액체 이동을 가능하게 하는 물질 내에 또는 물질 상에 샘플 적용 구역과 검출 구역을 함유한, 분석물질의 측정을 위한 분석용 구성물 및, 특이적 결합 페어를 이용한 분석물질의 측정 방법에 관한 것이다. 여기서, 검출 구역은 접촉시에 분석물질이 아닌 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와 결합할 수 있는 방법으로 고정된 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 을 함유하고, 본 발명은 또한, 분석용 구성물을 함유한 분석물질 측정용 키트에 관한 것이다.

분석물질을 측정하기 위해 필요한 시약이 담체 물질 상에 또는 그 내부에 존재하는 분석용 구성물은 이전의 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들면 다음과 같다 : 미국 특허 제 4,861,711 호, 미국 특허 제 5,591,645 호, 및 유럽 특허 제 EP-A-0 291 194 호. 상기 문헌에 기재된 분석용 구성물들의 공통된 특징은 면역학적 검출 방법을 수행하기에 특히 적합하다는 것이다. 이들은 샘플 적용 구역과 이것의 하류에 위치한 검출 구역을 포함한다. 액체 샘플이 다공성 담체 물질 내의 모세관 힘의 결과로서, 샘플 적용 구역과 검출 구역 사이의 여러 가지 구역을 통해 이동하고, 이것에 의해 분석물질을 검출하는 데 필요한 시약을 흡수하여, 샘플 내의 분석물질과 시약이 반응하게 된다.

결합 파트너는 검출 구역 내에 고정화되며, 이것은 측정할 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있다. 분석물질이 여러 가지인 경우에는, 분석물질에 대한 상이한 결합 파트너들을 고체상 (solid phase) 에 고정시켜야만 한다.

미국 특허 제 4,861,711 호의 도 1 과 상세한 설명, 예를 들면 제 5 칼럼 제 57 행~제 6 칼럼 제 48 행에는, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 은, 분석물질과 특이적으로 결합하는 물질 상에 존재하는 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 인 에피토프와 결합하기 때문에, 분석물질과 결합하지는 않지만 보편적으로 사용될 수 있는 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 을 검출 구역 내에 고정화시킬 수 있다고 기재되어 있다. 따라서, 분석물질의 이동 복합체 및 상기 결합 물질은, 검출 반응 도중에 검출 구역 내에 고정화되고, 비복합체 이동 반응 성분들로부터 분리된다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

분석물질에 대해 특이적인 라벨링된 물질은 매우 중요한 역할을 하는데, 이는 이 물질이 분석물질에만 결합하고, 이어서 분석물질 및 분석물질과 결합한 라벨링된 물질로 구성되어 형성된 복합체를 검출 구역 내에 고정화하며, 또한 이동가능하며 반응하지 않은 반응 성분들을 검출 구역으로부터 제거하여, 액체 샘플 내에 분석물질이 존재하는지 나타낼 수 있기 때문이다. 이전의 기술 분야에서 공지된 라벨링된 물질은 분석물질에 특이적이다. 다시 말하면, 샌드위치 분석법의 경우, 이 라벨링된 물질은 예를 들면, 측정할 분석물질 (항원 또는 항체) 와 특이적으로 반응하는 항체 또는 항원이다. 그러나, 이 방법에서는 분석물질에 따라 분석물질에 대해 특이적인 각각의 라벨링된 결합 파트너를 제조해야만 한다.

이전의 기술 분야에서 공지된 라벨링 물질은 매우 많다. 과거에는 단점에도 불구하고 방사성 라벨링을 이용하였지만, 후에 대부분 효소 라벨링으로 대신하게 되었다. 최근에는 이전의 기술 분야의 문헌에 기재된 바와 같은 분석용 구성물에 특히, 금 또는 라텍스 입자와 같은 특정 라벨링 물질을 주로 이용하고 있다. 분석물질에 특이적으로 결합하는 물질 및 라벨링 물질로 구성된 접합물의 제조는 복잡하고, 상이한 분석물질들을 측정하고자 할 때는 각각의 분석물질에 특이적인 결합 파트너에 대해 최적 조건을 맞추어야 한다. 또한, 분석용 구성물 내에서 이러한 접합체를 싣고 이동하는 물질에 대해서도 각 경우마다 그 요구 조건을 최적으로 적용하여야만 한다. 이와 관련한 상기의 모든 안정성 문제는 종종 해결되어 왔다.

따라서, 본 발명의 목적은 측정할 분석물질에 관계없이 언제나 사용될 수 있는 분석용 구성물의 다목적 구조를 제공하는 것이며, 여기서, 상기 분석물질 또는 분석물질에서 유도되어 상기 분석물질을 나타내는 물질은 특이적인 파트너 결합에 의해 검출될 수 있다.

상기 목적은 청구의 범위에 기재된 바와 같이 본 발명의 주제 물질에 의해 달성될 수 있다.

### 발명의 구성 및 작용

본 발명은, 샘플 적용 구역과 검출 구역 사이에 액체 이동을 가능하게 하는 물질 내에 또는 물질 상에 샘플 적용 구역과 검출 구역을 포함한 분석물질의 측정을 위한 분석용 구성물 (여기서, 검출 구역은 접촉시에 분석물질이 아닌 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와 결합할 수 있는 방법으로 고정된 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 을 함유한다) 에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 은 액체에 의해 이동될 수 있도록 물질 상에 함침된 검출 구역의 상류에 존재하여, 접촉시에 분석물질이 아닌 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 에 결합할 수 있고, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 및 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 는 측정할 분석물질에 특이적으로 결합하거나, 측정할 분석물질 또는 분석물질로부터 유도되어 분석물질을 나타내는 물질의 일부와 반응하는 것을 특징으로 하는 분석용 구성물에 관한 것이다.

본 발명은 또한, 상기를 특징으로 하는 분석용 구성물을 함유하고, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 및 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 중 적어도 하나를 더 함유하는, 분석물질 측정용 키트에 관한 것이다.

마지막으로, 본 발명은 또한, 분석물질로부터 유도되어 분석물질을 나타내는 물질을, 본 발명에 따른 분석물 측정을 위한 분석용 구성물 내에서 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너와 접촉시킨 다음, 이를 샘플 적용 구역의 상류에 위치한 검출 구역으로 액체 이동에 의해 이동시키고, 검출 구역 내에서 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 에 결합시킨 다음, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 1 의 라벨링 물질을 기준으로 측정하는 것을 특징으로 하는, 특이적 결합 페어를 이용한 분석물질 측정 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 분석용 구성물의 필수적인 특징은 분석용 구성물 내에서 검출 구역으로 액체가 이동할 수 있다는 점이다. 이러한 액체 흐름은 예를 들면, 적당하게 제조된 움푹 패인 물체 내에서의 인력에 의해 가능하다. 인력의 한 형태인 원심력에 의해 액체 이동을 가능하게 하는 장치가 유럽 특허 제 EP-B-0 052 769 호에 기재되어 있다. 그러나, 본 발명에 따른 분석용 구성물은 바람직하게는, 모세관 힘에 의해 액체를 이동시킬 수 있는 흡수 물질을 함유한다. 이와 관련하여, 본 발명에 따른 분석용 구성물의 각 구역의 물질들은 동일하거나 상이할 수 있다. 대부분의 경우, 각 작용을 최적으로 수행하기 위해서는 각각의 구역은 서로 다른 물질로 구성된다.

적합한 강력 흡수제 모세관 활성 물질은 기본적으로, 예를 들어 미국 특허 제 US-A-4,861,711 호, 제 US-A-5,591,645 호, 또는 유럽 특허 제 EP-A-0 291 194 호에 기재된 바와 같은, 이른바 건조 시험에서 액체를 흡수하기 위해 사용될 수 있는 모든 것이다. 다공성 물질, 예컨대 니트로셀룰로스 막과 같은 막이 유리한 것으로 입증되었다. 그러나, 섬유, 흡수 매트릭스 물질, 예컨대, 플리스, 직물 또는 편직물도 사용할 수 있다. 특히, 플리스가 바람직하다. 섬유 매트릭스 물질은 유리, 셀룰로스, 셀룰로스 유도체, 폴리에스테르, 폴리아미드를 포함하고, 또한 비스코스, 인조 양모 및 폴리비닐 알콜도 포함한다. 예를 들면, 유럽 특허 제 EP-B-0 326 135 호에 공지된 바와 같은, 셀룰로스 기재의 섬유, 폴리에스테르 및/또는 폴리아미드를 기재로 한 중합체 섬유, 및 아세트/또는 에스테르기를 가진 유기 결합제로 만들어진 플리스를 본 발명에 따라 사용할 수 있다. 또한, 유럽 특허 제 0 571 941 호에 기재된 바와 같은, 용융성 코폴리에스테르 섬유 외에도 유리 섬유, 폴리에스테르 섬유, 폴리아미드 섬유, 셀룰로스 섬유 또는 셀룰로스 유도 섬유를 함유한 플리스 물질을 본 발명에 따른 분석용 구성물에 사용할 수 있다. 티백 종이와 같은 종이도 적합하다.

본 발명에 따른 분석용 구성물의 조작성을 향상시키기 위해, 그 자체로는 액체에 불투과성이며, 매트릭스 물질 내의 액체 흐름에 역영향을 주지 않으며, 분석용 구성물 상에서 일어날 수 있는 반응에 대해 불활성인, 흡수제 모세관 활성 물질 또는 상이한 흡수제 모세관 활성 물질들을 딱딱한 담체 물질 상에 배열할 수 있다. 폴리에스테르 박막은 매트릭스 물질이 액체 이동을 가능하게 할 수 있도록 부착된 바람직한 담체 물질일 수 있다.

본 발명에 따른 분석용 구성물에서 각각의 구역은 담체 물질 상에 서로 위끝이 이어지도록 이웃하여 배열될 수 있고, 또는 부분적으로 위끝이 이어지도록 부분적으로 이웃하여 배열될 수 있다. 본 발명에 따른 분석용 구성물은 샘플 적용 구역과 검출 구역이 담체 물질 상에 이웃하여 정렬된 것이 특히 바람직하다. 이와 관련하여, 이웃하여 배열된다는 것은 이들 구역이 이웃하여 서로 직접적으로 접촉되거나, 또는 본질적으로 서로 다른 구역에 의해 형성된 하나의 평면에 배열되는 것을 의미한다.

샘플 적용 구역은, 본 발명에 따른 분석용 구성물에서, 특정한 분석물질 또는 분석물질로부터 유도되어 분석물질을 나타내는 물질이 존재하는지, 그리고 임의로 그 존재량이 얼마인지를 측정하기 위해 샘플을 적용하는 부분이다.

검출 구역은, 본 발명에 따른 분석용 구성물에서, 검사할 분석물질 또는 분석물질에서 유도되어 분석물질을 나타내는 물질이, 분석용 구성물에 적용된 샘플에 존재하는지 측정하는 부분이다. 이러한 측정은 정성, 반정량 또는 정량 분석일 수 있다. 이와 관련하여, 반정량 분석은, 분석물질 또는 분석물질에서 유도되어 분석물질을 나타내는 물질에 대해 특정한 농도값을 측정하는 것이 아니라, 분석물질 농도가 어느 농도 범위에 있는지를 측정하는 것을 의미한다.

특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 은 접촉시에 분석물질이 아닌 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와 결합할 수 있는 방법으로 검출 구역 내에 고정화된다. 고정화는 화학 반응, 즉, 공유 결합의 형성에 의해 수행될 수 있다. 그러나, 흡착력에 의해서도 수행될 수 있으며, 이는 공유 결합의 형성을 제외한 모든 가능한 것들을 포함한다. 함침시켰을 때, 단백질 및 아미노산이 공유 결합없이 단단히 결합할 수 있는 니트로셀룰로스 막이 검출 구역에 주로 사용된다.

본 발명에 따라, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 외에도 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 이 분석용 구성물에 있어야 한다. 이 라벨링된 파트너는 고정화되지 않고 액체에 의해 이동될 수 있는 함침된 형태로 존재하여야 한다. 다시 말하면, 이 라벨링된 파트너는 액체에 의해 검출 구역으로 이동될 수 있어야 한다. 유리하게는, 이 라벨링된 파트너는 함침된 매트릭스 물질로부터 가능한 한 적은 액체에 의해 완전히, 즉, 정량적으로 이동되어야 한다. 유럽 특허 제 EP-B-0 326 135 호에 기재된 바와 같이, 이를 위해 매트릭스 물질로서 플리스가 특히 적당한 것으로 밝혀졌다.

특이적 결합 페어는 이전의 기술 분야에 공지되어 있는데, 예를 들면, 헵텐과 항체, 항원과 항체, 렉틴과 당 또는 다당류, 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin)과 비오틴, 그리고, 핵산과 핵산, 리간드와 수용체가 포함한다. 이와 관련하여, 항원은 그에 대해 실험적으로 항체가 생산되는 임의의 분자일 수 있다. 항원은 또한, 에피토프라고 불리며, 항체에 의해 특이적으로 인식되어 항체의 특정 부분 또는 항체일 수 있다. 핵산은 상보적인 염기를 통해 결합할 수 있는 핵산의 모든 가능한 형태인 것으로 해석하여야 한다. 구체적으로, DNA, RNA 및 핵산 유사체, 예컨대, 펩티드 핵산 (PNA 참조, WO 92/20702 호) 을 언급할 수 있지만, 이것에만 한정되는 것은 아니다. 리간드와 수용체는 특히 일반적으로, 호르몬과 호르몬 수용체와 같은 두 파트너 사이의 특이한 결합 상호작용인 것으로 언급된다.

본 발명에 따른 분석용 구성물의 바람직한 구현예에서, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 은 분석물질에 직접 결합된 또 다른 항체 상의 에피토프를 인식하는 항체이다. 항체가 직접 결합된 에피토프는 이어서, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와 결합한다. 특히 바람직하게는, 아비딘 또는 스트렙타비딘이, 비오틴에 특이적으로 결합하는 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 로서 사용된다. 이어서, 비오틴은 특

이적 결합 페어 1의 파트너 2를 형성한다.

본 발명에 따른 분석용 구성물의 바람직한 구현예에서, 특이적 결합 페어 2의 파트너 1은 특이적 결합 페어 2의 파트너 2에 대한 항체이다. 이와 같은 특이적 결합 페어 2의 파트너 2는 바람직하게는, 본 발명에 따른 헵텐, 유리하게는 검사할 샘플에 존재하는 헵텐이다. 특히 바람직하게는, 디기톡시제닌, 디기톡신, 디곡시제닌 또는 디곡신이 헵텐으로서 사용된다.

기본적으로 면역분석법에 있어 이전 분야에 공지된 모든 라벨링 물질이 특이적 결합 페어 2의 파트너 1의 라벨링으로서 적합하다. 구체적으로는, 방사성 라벨링 물질 또는 효소 라벨링 물질, 예컨대, 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제 또는 갈락토시다제 또는 형광단이 있다. 그러나, 이른바 직접 라벨링 물질, 즉 다른 조작없이 육안으로 인식가능한 색깔을 띤 라벨링 물질이 특히 바람직하게 사용된다. 이러한 유형의 유리한 라벨링 물질로 예를 들면, 물에 불용성인 입자, 예컨대, 금속 또는 라텍스 입자, 및 안료, 예컨대, 실리케이트, 카본 블랙 또는 셀레늄이 있다. 본 발명에 따른 라벨링 물질로서 금속 입자가 특히 바람직하게 사용된다. 콜로이드성 금이 라벨링 물질로서 특히 바람직하다. 라벨링 물질은 특이적 결합 페어 2의 파트너 1에 공유결합으로 또는 흡착으로 결합할 수 있으며, 여기서 흡착은 공유 결합을 제외한 모든 가능한 것들을 포함한다. 직접 라벨링 물질로서 색깔을 띤 라텍스 입자를 사용하는 경우에는, 공유 결합이 존재하는 것이 바람직하다. 직접 라벨링 물질로서 특히 콜로이드 금과 같은 콜로이드성 금속을 사용하는 경우에는 흡착 결합을 이용하는 것이 바람직하다.

항체-금 접합물의 제조는 예를 들면, 문헌 [Roth, J. 광학 및 전자현미경적 세포화학을 위한 콜로이드성 금 마커 시스템 (The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry), Bullock, G.R. 및 Petrusz, P., 면역세포화학 기술 (Techniques in Immunocytochemistry), 2권, New York, Academic Press, 1983, p. 216~284]에 공지되어 있다.

특이적 결합 페어 2의 라벨링된 파트너 1은 본 발명에 따른 분석용 구성물의 다른 위치에 놓여질 수도 있다. 이는 예를 들어, 목적하는 반응 순서, 이용가능한 샘플의 양에 따라 달라지며, 또는 분석용 구성물이 액체 샘플의 측정을 위한 것이라면 분석물질의 농도에 따라 달라진다.

즉, 특이적 결합 페어 2의 라벨링된 파트너 1은 샘플 적용 구역 내에 위치할 수도 있고, 샘플 적용 구역과 검출 구역 사이인 샘플 적용 구역의 하류에 정렬될 수도 있으며, 또한, 샘플 적용 구역의 상류에 위치할 수도 있다. 적어도 후자의 경우, 우선 필요한 것은 본 발명에 따른 분석용 구성물에 샘플 적용 구역 외에도 용리제 적용 구역이 더 있어야 한다는 점이다. 이러한 용리제 적용 구역은 특이적 결합 페어 2의 라벨링된 파트너 1이 놓여진 위치의 상류에 위치하거나, 또는 특이적 결합 페어 2의 라벨링된 파트너 1이 놓여진 위치와 같다. 그러므로, 용리제 적용 구역은 본 발명에 따른 분석용 구성물의 샘플 적용 구역이나 샘플 적용 구역의 상류에 존재할 수 있다. 이러한 용리제 적용 구역은, 검사할 샘플이 액체가 아니거나 분석물질의 측정에 충분한 액체를 제공하지 못할 때, 즉, 분석물질 및 필요한 시약들을 검출 구역으로 이동시키는 데에 충분한 액체를 제공하지 못할 때에는 특이적 결합 페어 2의 라벨링된 파트너 1이 놓여진 위치에 관계없이 항상 제공된다.

상기에 서술한 바와 같은 본 발명에 따른 분석용 구성물의 구조는 보편적으로 특이적 페어 결합에 의해 검출가능한 임의의 분석물질을 측정하는 데에 적합하다. 이를 위해, 특이적 결합 페어 1의 파트너 2 및 특이적 결합 페어 2의 파트너 2를 함유한, 분석물질에서 유도되어 분석물질을 나타내는 물질을 본 발명에 따른 분석용 구성물 내에서 특이적 결합 페어 2의 라벨링된 파트너 1과 접촉시키고, 분석용 구성물 내에서 샘플 적용 구역의 상류에 위치한 검출 구역으로 액체 이동에 의해 이동시킨 다음, 검출 구역 내에서 특이적 결합 페어 1의 파트너 1에 결합시키고, 특이적 결합 페어 2의 파트너 1의 라벨링 물질을 기준으로 측정한다. 이러한 측정을 위해, 검출 구역 내에서 고정화되지 않는 이동 반응 성분들을 액체에 의해 검출 구역으로부터 제거하는 것이 특히 유리하다. 액체 샘플인 경우, 샘플 액체가 검출 구역으로부터, 고정화되지 않은 이동 반응 성분들을 제거하기에 충분하지 않다면, 추가의 액체를 분석용 구성물에 적용할 수 있다. 이 경우, 추가로 적용하는 것은 샘플 적용 구역 또는 특정 용리제 적용 구역에서 행해져야 한다.

분석물질을 나타내는 물질은 여러 가지 방법으로 제조될 수 있다. 분석물질이 항원인 경우, 예를 들면 분석물질에 결합하는 두 가지 항체와 분석물질을 반응시킬 수 있다. 이 경우, 두 가지 항체 중 하나는 특이적 결합 페어 1의 파트너 2를 지니고, 다른 하나의 항체는 특이적 결합 페어 2의 파트너 2를 지닌다. 분석물질이 예를 들어 특정 에피토프의 여러 복제물을 함유한다면, 두 가지 항체는 동일할 수 있다. 본 발명에 따라, 두 항체 사이에 분석물질이 들어간 샌드위치 복합체가 완전히 형성될 때까지, 분석물질, 특이적 결합 페어 1의 파트너 2를 지닌 항체 및 특이적 결합 페어 2의 파트너 2를 지닌 항체의 혼합물을, 본 발명에 따른 분석용 구성물 상에서 특이적 결합 페어 2의 파트너 1과 접촉시키지 않아야 할 필요는 없다. 궁극적으로, 분석 결과를 측정할 때에, 특이적 결합 페어 1의 파트너 1 상의 결합된 샌드위치 복합체가 검출 구역 내에 포함되는 것이 중요하다. 이러한 샌드위치 형성은 분석물질과 두 샌드위치 형성 항체의 혼합물이 본 발명에 따른 분석용 구성물에 적용될 때에 이미 완성되어 있을 수 있지만, 또한 샘플 적용 구역과 검출 구역 사이에서 시약이 액체 이동되는 동안 이루어져도 된다. 극단적으로는 검출 구역 내에서 샌드위치 반응이 수행된다. 분석물질로부터 유도되어 분석물질을 나타내는 물질의 용어는 분석물질로부터 유도되어 검출 구역내에서 분석물질을 나타내는 물질이 되는 성분들을 함유한 물질의 혼합물도 포함한다.

항체를 분석물질로서 측정한다면, 항원 분자가 특이적 결합 페어 1의 파트너 2를 지니고, 항원 분자의 다른 부분이 특이적 결합 페어 2의 파트너 2를 지니는 경우인 상기 반응에서와 유사한 방법으로, 두 항체 대신에, 항원 또는 항원 에피토프를 제출하는 올리고펩티드를 분석물질로서 사용할 수 있다. 측정할 항체의 이중 항원 샌드위치 복합체를 측정하기 위해, 앞서 상술한 항원 측정 방법과 유사한 방법들이, 각 경우에 있어서, 특이적 결합 페어 1의 파트너 2를 지닌 항원 및 특이적 결합 페어 2의 파트너 2를 지닌 항원을 형성시킨다.

본 발명에 따른 다목적 분석용 구성물의 구조는 또한, 핵산의 측정에 매우 적합하다. 대체로, 이를 위해 측정할 핵산을 검출할 수 있는 충분한 양으로 증폭시킨다. 이것은 예를 들면, 당업자에게 공지

된 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 또는 리가제 연쇄 반응 (LCR) 을 이용하여 수행할 수 있다. 뉴클레오타이드를 측정할 핵산에 상보적인 핵산에 연결시키고, 프라이머에 연결시키는, 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 출발한 PCR 을 이용한 증폭의 경우, 예를 들어, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 또는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 상기 뉴클레오타이드 또는 프라이머에 결합된 핵산의 복제물 내로 삽입시킬 수 있다. 이러한 방법으로 수득된 증폭 산물을, 상기 상보적인 증폭된 핵산이 갖지 않는 결합 페어 의 파트너 2 와 하이브리드시키면, 본 발명에 따른 분석용 구성물 상의 검출 구역 내에서 특이적 결합 페어 1 의 고정화된 파트너 1 에 결합되어 있는, 분석물질로부터 유도되어 분석물질을 나타내는 물질로 이용할 수 있고, 이를 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너에 의해 검출할 수 있게 된다.

또한, 이용할 수 있는 핵산의 양이 충분하다면 증폭시키는 것을 생략할 수 있고, 또는 특이적 결합 페어 1 또는 2 의 파트너 2 없이 핵산을 증폭시킬 수도 있다. 이어서, 분석물질을 나타내는 물질을 각 경우에서 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 및 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 지닌 두 가지 프로브를 하이브리드시켜 제조할 수 있다.

특히 바람직하게는, 라벨링되지 않은 뉴클레오타이드와 혼합된, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 또는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 지닌 뉴클레오타이드를 측정할 핵산을 증폭시키는 데에 사용하고, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 또는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 지닌 증폭된 핵산을, 증폭에 사용된 뉴클레오타이드 혼합물 내에 존재하지 않는 특이적 결합 페어의 파트너 2 를 지닌 핵산과 하이브리드시킨다. 이렇게 하여, 각 가닥이 특이적 결합 페어의 서로 다른 파트너를 지닌 핵산 이중 가닥을 수득한다. 또한, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 또는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 대신에, 라벨링되지 않은 뉴클레오타이드와 함께 프라이머로서 상기 파트너를 지닌 올리고뉴클레오타이드를 사용할 수 있다. 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 로서는 비오틴을 특히 바람직하게 사용하고, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 로서는 헵텐, 예컨대, 플루오레스세인, 로다민, 디곡신 또는 더욱 바람직하게는 디곡시제닌을 사용한다. 프라이머를 사용할 때에는, 비오틴화된 것이 특히 유리한 것으로 밝혀졌다.

비오틴화된 뉴클레오타이드 및 프라이머가 상업적으로 이용가능하거나, 또는 플루오레스세인, 로다민, 디곡신 또는 특히, 디곡시제닌과 같은 헵텐을 지닌 핵산 단편(fragment) 또는 핵산과 같은 물질을 제조할 수 있는 키트가 상업적으로 이용가능하므로, 숙련된 당업자는 핵산으로부터 유도되어 핵산을 나타내는 물질을 매우 용이하게 수득할 수 있고, 본 발명에 따른 분석용 구성물을 이용하여 이들을 빠르고 간단하게 검출할 수 있다.

물론, 본 발명에 따른 다목적 분석용 구성물 뿐만 아니라, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 또는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 포함하는 분석물질의 측정용 키트를 또한 제공할 수 있다. 이들 파트너는 예를 들어, 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 핵산, 항체, 헵텐 또는 항원 또는 에피토프, 또는 렉틴 또는 리간드 수용체에 접합될 수 있다. 이들 물질은 앞서 설명한 의미를 지닌다. 이와 같이, 필요한 사람에게 특정 분석물질의 측정을 위해 필요한 모든 첨가 시약 또는 성분, 그리고 다목적 분석용 구성물을 제공할 수 있다. 이와 관련하여, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 및 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 가 분리된 용기에 존재하는지, 하나의 용기에 존재하는지는 중요하지 않다. 이것은 측정할 분석물질을 두 개의 항체를 이용하거나 샌드위치 복합체를 통한 항원을 이용하여 측정하는 시스템일 때 특히 그러하다. 핵산의 측정을 위한 키트를 조립하려 한다면, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 또는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 지닌 뉴클레오타이드 또는 프라이머를, 뉴클레오타이드 또는 프라이머와 접합될 파트너와는 다른, 특이적 결합 페어의 파트너 2 를 지닌, 측정할 핵산에 상보적인 핵산과 분리하여 저장하는 것이 유리하다.

상기의 본 발명에 따른 다목적 분석용 구성물은 특히, 분석물질이 매우 다양할 수 있는 연구 및 개발에 있어서, 분석물질 측정에 있어서 유리하다. 본 발명에 따른 분석용 구성물은 특히, 핵산의 측정에 있어서 유리하다. 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 또는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 와 접합되는 뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드의 다양한 종류가 시판중이다. 상업적으로 시판중인 키트로 용이하게 제조될 수 있는, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 또는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 지닌 핵산 프로브도 마찬가지이다. 특히, 비오틴 및/또는 디곡신 또는 디곡시제닌을 지닌 핵산 프로브를 이 방법으로 용이하게 제조할 수 있다.

또한, 라벨링된 결합 파트너가, 분석물질의 라벨링된 결합파트너를 이용한 면역분석법에 있어서 중요한 성분을 제출하기 때문에 본 발명에 따른 분석용 구성물의 다목적 구조물은 유리하다. 이전에는 분석물질에 따라 해당하는 라벨링된 결합파트너를 제조하고, 분석용 구성물 상의 반응 및 보관 조건을 최적으로 하는 것이 일반적이었다. 과거에는 이를 위해 많은 작업이 필요하였다. 이제, 본 발명에 따른 분석용 구성물은 보편적으로 사용될 수 있는 원소를 제공한다. 액체 시약인 특정 시약들은 작은 비용으로 간단하게 제조할 수 있다. 최적 조건은 특히 분석용 구성물 상에서 상기 시약의 저장 수명에 대해서는 꼭 필요한 것은 아니다.

그러나, 또한 필요하다면, 본 발명에 따른 분석용 구성물을, 액체 시약인 특정 시약을 사용한 광범위 분석용 구성물로서 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 분석물질의 특이한 검출을 위해 필요한 모든 시약들을 함유한 본 발명에 따른 분석용 구성물을 출발로 하여 분석용 구성물을 제조하는 것이 가능하다. 이와 같이, 샌드위치 복합체 형성을 이용한 항원 시험을 위해 필요한 항체들은 본 발명에 따른 분석용 구성물 상에 집적되어 있을 수 있는데, 항체중 하나는 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와 접합되고, 다른 하나는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 와 접합된다. 샌드위치 복합체 형성을 이용하여 항체를 검출하기 위한 본 발명에 따른 분석용 구성물에 대해서도 마찬가지이다. 이 경우, 필요한 항원의 일부는 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와 접합되고, 항원의 다른 일부는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 와 접합하여 분석용 구성물 상에 집적되어 있다. 이와 같은 접합체는 서로 위끝이 이어져 있거나 또는 서로 이웃하여 본 발명에 따른 분석용 구성물의 구역들 내에, 또는 공통된 구역 내에 배열될 수 있다. 이 경우, 두 접합체는 샘플 적용 구역 내에 수용될 수도 있고, 또는 접합체 중 하나는 샘플 적용 구역 내에, 다른 하나는 샘플 적용 구역과 검출 구역 사이의 구역에 수용될 수 있으며, 두 접합체가 샘플 적용 구역과 검출 구역 사이의 구역에 따로따로 또는 함께 수용될 수도 있다. 용리제 구역이 샘플 적용 구역의 상류에 배열된다면, 앞서 언급한 가능한 경우 외에도 특이적 결합 페어 1 및 2 의 파트너 2 를 지닌 항원

또는 항체가 용리제 구역과 샘플 적용 구역 사이에 따로따로, 또는 함께 배열될 수 있다. 분석물질의 측정을 위해 필요한 모든 시약들을 함유한 이러한 분석용 구성물은 본 발명에 따라 간단하고 보편적인 구조라는 이점이 있고, 샘플만 적용하면 검출 구역에서 결과를 판독하기 전에 다른 조작 단계가 더 이상 필요없기 때문에, 사용자가 조작하기가 매우 간단하다.

본 발명에 따른 분석용 구성물은 하나 이상의 여러 가지 분석물질을 측정하는 데에도 사용할 수 있다. 예를 들면, 최근에 HIV 감염에 대해 샘플을 검사할 때, 하나 또는 여러 개의 항원 타입, 즉, HIV 1, HIV 2 또는 HIV 1 서브타입 0 에 대한 항체들이 존재하는지 측정하여야만 한다. 한 가지 타입에 대한 항체의 존재는 양성 반응을 나타내기에 충분하다. 정확히 어느 형에 대한 항체가 발견되었는지는 적어도 스크린법에 있어서 두번째로 중요한 문제이다. 이러한 측정에 적합한 본 발명에 따른 분석용 구성물은 각 경우에 있어서, 검사할 샘플에 대해 각 항체에 대한 항원 접합체의 페어를 함유한다. 각각의 페어는 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와 접합된 항원, 및 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 와 접합된 항원을 함유하고, 여기서 항원은 특정한 항체 타입에 특이적으로 결합한다. 각 경우에 있어서, 항원 접합체는 분리되어 존재할 수 있다. 그러나, 또한 모든 항원 접합체를 혼합하여 한 구역 내에 함께 수용하는 것도 가능하다. 특이적 결합상 1 및 2 의 파트너 2 와, 항원 또는 항체의 접합체에 대한 상기 일반적인 설명은 본 발명에 따른 분석용 구성물 내의 접합체의 위치에 대해서도 적용된다.

인플루엔자의 측정을 위한 유사한 분석용 구성물은 인플루엔자 바이러스 A 및/또는 인플루엔자 바이러스 B 의 존재를 검출할 수 있다. 이를 위해, 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항체와 특이적 결합 페어 1 및 2 의 파트너 2 와의 접합체들 뿐만 아니라, 인플루엔자 B 바이러스에 대한 항체와 특이적 결합상 1 및 2 의 파트너 2 와의 접합체들을 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 분석용 구성물 내에 상기 두 가지 바이러스 타입 중 적어도 한 가지가 존재한다면, 검출 구역에서 양성 결과가 나타난다.

또한, 본 발명에 따른 분석용 구성물은 추가의 작용 구역을 함유할 수 있다. 예를 들면, 완전 혈액 검사에 있어서, 본 발명에 따른 분석용 구성물 내에, 혈장 또는 혈청을 완전 혈액으로부터 맑은 용액으로 분리하고, 혈액 세포를 보유하는 구역을 제공하는 것이 유리한 것으로 밝혀졌다. 이어서, 맑은 액체만을 검출 구역으로 이동시킨다. 예를 들어, EP-A-0 045 476 호에는 유리 섬유 플리스가 완전 혈액으로부터 혈장 또는 혈청을 분리하는 데 적합한 것으로 기재되어 있다. 완전 혈액으로부터 혈장 또는 혈청을 분리하는 데 적합한 이와 같은 매질은 예를 들면, 샘플 적용 구역 내에, 또는 샘플 적용 구역과 검출 구역 사이에 위치할 수 있다.

본 발명에 따른 분석용 구성물의 다목적 구조는, 하나 또는 여러 가지 분석물질의 측정을 위한 모든 시약들을 함유한 분석용 구성물이므로, 전개 조작을 미리 해야 하는 것에 비해 전개를 매우 간단하게 하는 원리를 제공하므로, 전개 시간이 짧아질 수 있다.

본 발명에 따른 두 가지 특히 바람직한 분석용 구성물을 도 1 및 2 에 나타낸다.

본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다.

## 실시예 1

### 핵산의 측정

#### a) 분석용 구성물

도 1 에 따른 시험 스트립을 제조한다. 하기의 것들을 고온 용융 접착제 (Dynapol S 1358, 등록상표, 독일 Huls AG 사 제조) 를 사용하여, 서로 이웃하여 5 mm 나비로 약간 겹치도록, 폴리에스테르로 만든 10 cm 길이의 담체 박막 (6) (Melinex, 등록상표, 350  $\mu$ m 두께, 영국 Imperial Chemistry Industries 제조) 에 부착한다 :

- 유리 섬유 (직경: 0.49~0.58  $\mu$ m, 길이: 1000  $\mu$ m) 100 부 및 폴리비닐 알콜 섬유 (Kuralon VPB 105-2, 등록상표, Kuraray 사 제조) 5 부로 구성된 면적 중량 180 g/m<sup>2</sup> 의 플리스 (두께: 1.5 mm, 길이: 1.5 cm) 인 액체 집합 구역 (5)
- 1.5 cm 길이의 질산 셀룰로스 막 (CN 11301 형, 독일 Sartorius 사 제조) 인 검출 구역 (2)
- 폴리에스테르 섬유 80 부, 인조 양모 20 부 및 폴리비닐 알콜 20 부를 함유한, 두께 0.32 mm, 면적 중량 80 g/m<sup>2</sup> 의 8 mm 길이 플리스인 시료 적용 구역 (1); [이것의 제조 방법은 유럽 특허 제 0 326 135 호의 실시예 1 에 기재되어 있다.]
- 금 접합체를 함유한, 폴리에스테르 섬유 80 부, 인조 양모 20 부 및 폴리비닐 알콜 섬유 20 부로 구성된, 두께 0.32 mm, 면적 중량 80 g/m<sup>2</sup> 의 8 mm 길이 플리스인, 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너를 함유한 구역 (3) ; [이것의 제조 방법은 유럽 특허 제 0 326 135 호의 실시예 1 에 기재되어 있다.]
- 30 mm 길이 플리스 (Binzer TI 05 형, 독일 Binzer 사 제조) 인 용리제 적용 구역 (4).

#### 검출 구역 (2) :

스트렙타비딘 (streptavidin) 수용액 (7 mg/ml) 을 상기의 질산 셀룰로스 막에 선 투여 (line dosing) 로 적용한다. 이를 위해, 나비 약 0.5 mm 의 선이 형성되도록 투여량을 선택한다. 선 (7) 은 측정할 분석물질을 분석하도록 작용한다. 이어서, 이 막을 공기중에서 건조시킨다.

마우스 IgG 에 대한 토끼 IgG 의 다클론성 항체의 수용액 (제조사: DAKO Diagnostica GmbH, 독일 함부르크) (0.5 mg/ml) 을 스트렙타비딘 선으로부터 약 4 mm 거리에 선 투여로 적용한다. 이 경우 또한, 투여량은 나비 약 0.5 mm 의 선이 형성되도록 선택한다. 선 (8) 은 시험 스트립 작용의 대조로서 작용한다. 이어서, 이 막을 공기중에서 건조시킨다.

#### 금 접합체 플리스 (3) :

- 프렌스(Frens, G.)의 방법에 따라, 가열함과 동시에 시트르산 트리소듐염으로써 테트라클로로금 산 용액 0.01 중량%를 환원시켜, 평균 입자 직경 약 40 nm의 금 졸(sol)을 제조한다. [다양한 입자 크기를 갖는 금 분산액의 제조: 단일 분산 금 현탁액중의 입자 크기를 조절한 조절된 핵형성 (Preparation of gold dispersions of varying particle size: controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions in Nature): Physical Science 241 (1973), 20~22)].

- 로스 (Roth, J.)의 방법에 따라 항체 금 접합체를 제조한다. [광학 및 전자현미경적 세포화학을 위한 콜로이드성 금 마커 시스템, Bullock, G.R. 및 Petrusz, P. 편, Techniques in Immunocytochemistry, 2권, New York, Academic Press, 1983년, 216~284].

상기 금 졸 용액을 실온으로 냉각한 후, 0.2 M  $K_2CO_3$ 를 사용하여 금 졸의 pH 값을 항체의 등전점보다 높은 약 0.5 내지 1.0 pH로 조절한다. 금 졸의 광학 밀도 (OD) (525 nm, 1 cm 광로에서의 흡광도)는 대략 1.0이다. 디곡시제닌에 대한 단클론성 IgG 항체 (MAB digoxigenin IgG)의 투석 용액 (제조원: 독일 Boehringer Mannheim GmbH 사 제조)을 금 졸에 첨가한다. 항체 용액의 양은 금 졸 용액중의 농도가 대략 2  $\mu g/ml$ 이 되도록 선택한다. 실온에서 30 분간 교반한 후, 고농도의 소 혈청 알부민 용액 (접합체 용액중의 최종 농도: 1 mg/ml)을 첨가하여 금 접합체를 포화시킨다.

20 mM 트리스 완충액 pH 8.0에 대한 초여과에 의해 금 접합체를 농축하여 광학 밀도가 대략 20이 되게 한다. 이어서, 접합체 용액을 혼합하여 최종 농도 100  $\mu M$  Brij(등록상표) 및 0.05 중량%  $NaN_3$ 로 한다.

- 상기 방법으로 제조된 금 접합체 (광학 밀도, OD = 20)를 부피비 1:1의 함침 완충액을 사용하여 광학 밀도, OD = 10으로 조절한다. 함침 완충액은 하기 성분을 함유한다:

1 중량% 슈크로스;

200 mM HEPES;

100 mM NaCl;

140 mM 우레아;

6 mM N-아세틸시스테인;

2 mM EDTA;

0.1 중량% Tween 20 (등록상표).

폴리에스테르-인조 양모-폴리비닐 알콜 혼합 플리스를 먼저, 함침 용액을 함유한 탱크를 통해 일정 속도로 당긴 다음, 250  $\mu m$  간격을 둔 두 스테인레스 스틸 롤러 사이에서 압착시키고, 이어서, 공기 건조기를 순환시켜 건조시킨다. 상기 조건에서 플리스의 함침량은 약 270 ml/m<sup>2</sup>이다.

#### b) 클라미디아 트라코마티스 (*Chlamydia trachomatis*)의 증폭 생성물의 측정

143 염기쌍을 가진 클라미디아 트라코마티스의 잠복 플라스미드 (cryptic plasmid) 단편 (7.5 Kb)을 증폭시킨다. 이를 위해, 클라미디아 트라코마티스 프라이머 및 캡처 프로브 세트 (독일 Boehringer Mannheim 사 제조)의 프라이머를 사용한다 (프라이머 1:20-mer, 위치 274~295; 프라이머 2:24-mer, 위치 393~416 rev).

- 라벨링은 DIG-11-dUTP (디곡시제닌에 대한 DIG 스탠드) 및 5' 비오티닐화 캡처 프로브 (독일 Boehringer Mannheim 사 제조)를 사용하여 수행한다.

- PCR 마스터 혼합물은 염화 마그네슘 25 mmol, 두 가지 프라이머 0.2  $\mu mol$ , 각각의 데옥시뉴클레오타이드 0.1 mmol, 및 DIG-11-dUTP 0.02 mmol을 함유한 10 배 PCR 완충액 10  $\mu l$ , Taq 폴리머라제 2.5 U를 함유한다. 이 결과, DIG-11-dUTP 대 데옥시뉴클레오타이드의 라벨링 화학량적 관계는 1:5이다. 약 100 백제물/ $\mu l$ 의 잠복 플라스미드 단편 및 증류수를 함유한 용액 10  $\mu l$ 를 피펫으로 첨가하여 마스터 혼합물을 100  $\mu l$ 로 채운다. 마스터 혼합물을 10 분간 94 °C에서 용융시키고, 각각 94 °C에서 40 초, 52 °C에서 30 초, 그리고 72 °C에서 45 초의 순환을 35 회를 반복한다. PCR 생성물을 에티딩 브로마이드로 착색시킨 아가로스 겔 2.5 %로 확인한다.

- 5' 비오티닌 라벨링된 캡처 프로브 (위치 354~374) 1  $\mu l$ 를 증폭 생성물 50  $\mu l$ 에 30  $\mu mol$  농도로 첨가하여 하이브리드를 형성시킨다. 따라서, 라벨링된 캡처 프로브는 0.6  $\mu mol$  농도로 존재한다. 이어서, 샘플을 95 °C에서 5 분간 용융시킨 다음, 37 °C에서 15 분간 하이브리드시킨다.

- 도 1에 따른 앞서 상술한 시험 스트립에 대한 핵산을 측정하기 위해, 하이브리드 생성물 5  $\mu l$ 를 샘플 적용 구역 (1)에 적용한다. 이어서, 시험 스트립의 용리제 적용 부분 (4)를 5 초 동안 크로마토그래피 완충액에 함침시키고, 이때, 금 접합체를 함유한 구역 (3)이 액체에 함침되지 않도록 주의한다. 크로마토그래피 완충액은 하기 조성을 갖는다: 염화 나트륨 0.9 중량%, 인산 칼륨 50 mM, 소듐 아지드 0.09 중량%, 소 혈장 알부민 2 중량%, 및 Tween 20 (등록상표) 0.25 중량%.

용리제 적용 구역 (4)로부터 액체 집합 구역 (5)로 크로마토그래피 완충액을 10 분간 이동시킨다. 검출 구역 (2) 내의 2 개의 적색 선이 뚜렷하게 관찰되었으며, 따라서, 적색 검출선 (스테레타비딘 함유)은 양성 결과를 나타내고, 적색 대조선 (PAB 마우스 Fc $\gamma$  함유)은 분석용 구성물의 올바른 작동을 나타낸다.

#### 실시예 2

##### 인플루엔자 A/B 바이러스의 검출

### a) 분석용 구성물

도 1 에 따라 시험 스트립을 제조한다. 분석용 구성물의 모든 성분은 실시예 1 에 기재된 핵산의 검출을 위한 분석용 구성물과 같다.

### b) 인플루엔자에 특이적인 면역시약

인플루엔자 A 및 인플루엔자 B 바이러스의 핵단백질의 검출을 위한 항체를 입수한다 (Fitzgerald Industries Int. 사, Concord, Massachusetts, USA).

- 인플루엔자 A 의 핵단백질에 대한 마우스 IgG 의 비오틴 라벨링된 단클론성 항체를 제조하기 위해, 비오틴의 숙신이미드 에테르 유도체를 0.1 M 인산 칼륨 pH 8.5 중의 20 mg/ml 항체 용액에 6 배 물 과잉으로 첨가한다. 혼합물을 교반하면서 25 °C 에서 90 분간 배양한다. 리신을 최종 농도 10 mM 로 용액에 첨가함으로써 반응을 중단시킨다. 투석에 의하여 과잉의 비오틴화 시약을 제거하고, 용액을 냉동시킨다.

- 인플루엔자 B 에 대한 비오틴화 단클론성 항체를 유사한 방법으로 제조한다.

- 인플루엔자 A 의 핵단백질에 대한 디곡시제닐화 단클론성 항체를 제조하기 위해, 디메틸-설폭시드 (DMSO) 중에 용해된 디곡시제닌의 숙신이미드 에스테르 유도체를 0.1 M 인산 칼륨 중의 단클론성 항체 10 mg/ml 의 용액에 6 배 물 과잉으로 첨가하고, 이러한 방법으로 용액중의 DMSO 최종 농도는 5 부피% 가 된다. 혼합물을 교반하면서 25 °C 에서 60 분간 배양한다. 리신의 최종 농도가 10 mM 이 되도록 리신 1 몰 수용액을 첨가하여 반응을 중단시킨다. 20 mM 인산 칼륨 완충액 pH 8.0 에 대한 투석에 의하여 과잉의 비오틴화 시약을 제거하고, 용액을 사용할 때까지 냉동시킨다.

- 인플루엔자 B 의 핵단백질에 대한 디곡시제닐화 단클론성 항체를, 상기에 상술한 인플루엔자 A 의 핵단백질에 대한 단클론성 항체의 디곡시제닐화와 유사한 방법으로 제조한다.

사용되는 인플루엔자 A 및 인플루엔자 B 항체는 타입 특이적인데, 즉, 인플루엔자 A 항체는 인플루엔자 A 의 핵단백질만을 인식하고, 반면에 단클론성 인플루엔자 B 항체는 인플루엔자 B 바이러스의 핵단백질만을 인식한다. 그러나, 항체는 서브타입에 특이적이지는 않다. 즉, 인플루엔자 A 에 대한 단클론성 항체는 인플루엔자 A 의 모든 서브타입을 인식한다.

### c) 인플루엔자 A 및/또는 인플루엔자 B 바이러스의 측정

희석된 바이러스 배양 상청액을 샘플 물질로 사용하여 본 발명에 따른 분석용 구성물의 감수성을 시험한다. 바이러스를 MDCK 세포, 영구 개 신장 세포 균주 상에 배양한다. 일반적인 배양 배지에서 33 °C 에서 약 7 일간 배양한다. 서브타입 H3N2 (균주 Beijing 32/92) 를 인플루엔자 A 의 대표로 배양하고, 균주 B/harbin 7/94 를 인플루엔자 B 의 대표로 배양한다. 배양 상청액을 배양 배지로 2 배 희석한다.

용균 완충액 (소 혈청 알부민을 함유한 생리 식염수 중의 Zwittergent 3-10, 등록상표 6 %) 15 µl, 각각 다른 희석액으로부터의 배양 상청액 65 µl, 그리고 각각의 경우에 있어서, 인플루엔자 A 에 대한 비오틴화 단클론성 항체의 용액 5 µl 및 인플루엔자 A 에 대한 디곡시제닐화 단클론성 항체의 용액 5 µl 를 에펜도르프 튜브에 피펫으로 담거나, 또는 인플루엔자 B 에 대한 비오틴화 단클론성 항체의 용액 5 µl 및 인플루엔자 B 에 대한 디곡시제닐화 단클론성 항체 5 µl 를 에펜도르프 튜브에 피펫으로 담는다 (항체 접합체 스톱 용액의 농도는 각각 20 µg/ml 이다). 용균된 샘플을 진탕에 의해 간단히 균질화시키고, 이어서 80 µl 를 도 1 에 따른 시험 스트립의 금 접합 플리스 (3) 상에 피펫으로 적용한다. 이어서, 시험 스트립의 용리제 적용 구역 (4) 를 크로마토그래피 완충액 (염화 나트륨 0.9 중량%, 인산 칼륨 50 mM, 소듐 아지드 0.09 중량%, 소 혈장 알부민 2 중량%, 및 Tween 20 (등록상표) 0.25 중량%) 에 약 5 초간 함침시킨다. 검출 구역 (2) 의 시험 결과를 10 분 후에 판독한다.

인플루엔자 A 배양 상청액의 경우, 1:64 이하의 배양 희석율에서 양성 결과를 나타내는 적색 검출선이 관찰되었다. 인플루엔자 B 배양 상청액의 경우, 1:128 이하의 희석율에서 양성으로 나타났다. 모든 경우에 있어서, 대조선의 적색은 시험 스트립의 올바른 작동을 나타내었다.

## 실시예 3

### HIV 항체의 검출

#### a) 분석용 구성물

도 2 에 따른 시험 스트립을 제조한다. 하기의 것들을 고온 용융 접착제 (Dynapoi S 1358, 등록상표, 독일 Huls AG 사 제조) 를 사용하여, 서로 이웃하여 4 mm 나비로 약간 겹치도록, 폴리에스테르로 만든 10 cm 길이의 담체 박막 (6) (Melinex, 등록상표, 350 µm 두께, 영국 Imperial Chemistry Industries 제조) 에 부착한다 :

- 유리 섬유 (직경: 0.49~0.58 µm, 길이: 1000 µm) 100 부 및 폴리비닐 알콜 섬유 (Kuralon VPB 105-2, 등록상표, Kuraray 사 제조) 5 부로 구성된 면적 중량 100 g/m<sup>2</sup> 의 플리스 (두께: 0.9 mm, 길이: 1.4 cm) 인 액체 집합 구역 (5)

- 1.5 cm 길이의 질산 셀룰로스 막 (CN 11301 형, 독일 Sartorius 사 제조) 인 검출 구역 (2)

- Brij (등록상표) 1 중량% 에 함침된, 유리 섬유 (직경: 0.49~0.58 µm, 길이: 1000 µm) 100 부 및 폴리비닐 알콜 섬유 (Kuralon VPB 105-2, 등록상표, Kuraray 사 제조) 5 부로 구성된 면적 중량 100 g/m<sup>2</sup> 의 플리스 (길이: 1.2 cm) 인 혈장 또는 혈청 분리 구역 (10)

- 금 접합체를 함유한, 폴리에스테르 섬유 80 부, 인조 양모 20 부 및 폴리비닐 알콜 섬유 20 부로 구성

된, 두께 0.32 mm, 면적 중량 80 g/m<sup>2</sup>의 12 mm 길이 폴리스인, 특이적 결합 패어 2의 라벨링된 파트너를 함유한 구역 (3); [이것의 제조 방법은 유럽 특허 제 0 326 135 호의 실시예 1에 기재되어 있다],

- 디곡시제닐화 및 비오틴화 HIV 항원 함유한, 폴리에스테르 섬유 80 부, 인조 양모 20 부 및 폴리비닐 알콜 섬유 20 부로 구성된, 두께 0.32 mm, 면적 중량 80 g/m<sup>2</sup>의 12 mm 길이 폴리스인, 특이적 결합 패어 1 및 2의 파트너 2를 함유한 구역 (9); [이것의 제조 방법은 유럽 특허 제 0 326 135 호의 실시예 1에 기재되어 있다]

- 습윤제로 함침된 8 mm 길이 폴리에스테르 섬유 (PE 280 HC, 스위스 Seidengaze Thal 사 제조)인 샘플 적용 구역 (1).

#### 검출 구역 (2) :

스트렙타비딘 수용액 (4 mg/ml)을 상기의 질산 셀룰로스 막에 선 투여에 의해 적용한다. 이를 위해, 투여량은 나비 약 0.4 mm의 선이 형성되도록 선택한다. 이 선은 HIV 항원을 검출하는 역할을 한다. 이어서, 이 막을 공기중에서 건조시킨다.

마우스 IgG에 대한 토끼 IgG의 다클론성 항체의 수용액 (제조원: DAKO Diagnostica GmbH, 독일 함부르크) (0.5 mg/ml)을 스트렙타비딘 선으로부터 약 4 mm 거리에 선투여에 의해 적용한다. 이 경우 또한, 투여량은 나비 약 0.4 mm의 선이 형성되도록 선택한다. 선 (8)은 시험 스트립 작용의 대조로서 한다. 이어서, 이 막을 공기중에서 건조시킨다.

#### 금 접합체 플리스 (3) :

- 실시예 1a에 기재된 바와 같이, 평균 입자 직경 약 40 nm의 금 졸을 제조한다.

- 실시예 1a에 기재된 바와 같이, 항체-금 접합체를 또한 제조한다.

- 이와 같은 방법으로 제조된 금 접합체를 항침 완충액을 사용하여 광학 밀도 OD = 3 (525 nm, 1 cm 광로에서의 흡광도)으로 조절한다. 항침 완충액은 하기 성분을 함유한다 :

100 mM HEPES, pH 7.5;

50 mM NaCl;

0.5 중량% 수크로스;

70 mM 우레아;

3 mM N-아세틸시스테인;

1 mM EDTA;

0.1 중량% Tween 20 (등록상표).

폴리에스테르-인조 양모-폴리비닐 알콜 혼합 플리스를 먼저, 항침 용액을 함유한 탱크를 통해 일정 속도로 당긴 다음, 250 µm 간격을 둔 두 스테인레스 스틸 롤러 사이에서 압착시키고, 이어서, 공기 건조기를 순환시켜 건조시킨다. 상기 조건에서 플리스의 함침량은 약 270 ml/m<sup>2</sup>이다.

#### 디곡시제닐화 및 비오틴화 HIV 항원을 함유한 플리스 (9) :

HIV 1의 gp 41 위치로부터 디곡시제닐화된 펩티드 및 비오틴화된 펩티드를 제조하는 방법은 국제 특허 출원 PCT/EP95/02921 호의 실시예 1에 기재되어 있다. 각각의 펩티드는 각각의 경우에서 디곡시제

닌 및 비오틴 유도체로서 페어로(pair-wise) 사용된다. 이들의 항침 용액중의 혼합 농도는  $0.7 \times 10^{-7}$  mol/l 및  $3 \times 10^{-7}$  mol/l이다. 또한, 항침 용액은 하기를 함유한다 :

100 mM MES 완충액, pH 6.0;

50 mM NaCl;

2 중량% 수크로스;

1 중량% 소 혈청 알부민;

3 mM N-아세틸시스테인;

0.06 중량% Tween 20 (등록상표);

1 mM EDTA.

폴리에스테르-인조 양모-폴리비닐 알콜 혼합 플리스를 상기 항침 용액에 함침시키고, 이어서, 공기 건조기를 순환시켜 건조시킨다. 상기 조건에서 플리스의 함침량은 약 270 ml/m<sup>2</sup>이다.

#### b) HIV 감염의 측정

약 60 µl의 샘플 용량 (혈장 또는 혈청)을 도 2에 따른 상기 시험 스트립의 샘플 적용 구역 (1)로 적용한다. 15 분간 기다린 다음, 검출 구역 (2)를 시각적으로 평가한다. 대조선 (8) 위치에만 적자색 선이 나타나면, 비반응성 샘플 (HIV 감염이 검출 안됨)을 표시한다. 대조선 (8) 및 검출선

(7)의 두 적자색 선이 나타나면, 반응성 샘플 (HIV 감염이 검출됨)을 표시한다.

#### 발명의 효과

본 발명에 따라 특이적 결합 페어를 이용하여, 측정할 분석물질에 관계없이 하나 또는 하나 이상의 분석 물질을 측정할 수 있는 분석용 구성물의 다목적 구조가 제공된다.

본 발명의 분석용 구성물은 분석물질의 측정을 위해 필요한 모든 시약들을 함유하고 있어, 샘플만 적용하면 검출 구역에서 결과를 판독하기 전에 다른 조작 단계가 더 이상 필요없기 때문에, 사용자가 조작하기가 매우 간단하다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

샘플 적용 구역과 검출 구역 사이에 액체 이동을 가능하게 하는 물질 내에 또는 물질 상에 샘플 적용 구역과 검출 구역을 포함한 분석물질의 측정을 위한 분석용 구성물 (여기서, 검출 구역은 접촉시에 분석물질이 아닌 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와 결합할 수 있는 방법으로 고정된 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 을 함유한다) 에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 이 액체에 의해 이동될 수 있도록, 물질 상에 함침된 검출 구역의 상류에 존재하는 분석용 구성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 특이적 결합 페어를 파트너들이 하기를 포함하는 군에서 선택되는 분석용 구성물 :

헵텐과 항체, 항원과 항체, 렉틴과 당/다당류, 리간드와 수용체, 아비딘/스트렙타비딘과 비오틴, 핵산과 핵산.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 이 아비딘 또는 스트렙타비딘인 분석용 구성물.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 1 이 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 에 대한 항체인 분석용 구성물.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 1 이 디곡시제닌 또는 디곡신에 대한 항체인 분석용 구성물.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 1 이 효소 또는 직접 라벨링 물질로 라벨링된 분석용 구성물.

#### 청구항 7

제 6 항에 있어서, 직접 라벨링 물질로서 금속 또는 라텍스 입자를 사용하는 분석용 구성물.

#### 청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항중 어느 한 항에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 이 샘플 적용 구역에 위치하는 분석용 구성물.

#### 청구항 9

제 1 항 내지 제 7 항중 어느 한 항에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 이 샘플 적용 구역의 상류인 구역에 위치하고, 이때, 용리제 적용 구역이 또한, 라벨링된 파트너를 함유한 구역의 상류에 위치하거나, 라벨링된 파트너를 함유한 구역이 용리제 적용 구역과 동일한 분석용 구성물.

#### 청구항 10

제 1 항 내지 제 7 항중 어느 한 항에 있어서, 샘플 적용 구역이 용리제 적용 구역과 동일한 분석용 구성물.

#### 청구항 11

제 10 항에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 이 용리제 적용 구역 및 샘플 적용 구역의 하류에 위치하는 분석용 구성물.

#### 청구항 12

제 10 항에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너 1 이 샘플 적용 구역 및 용리제 적용 구역에 위치하는 분석용 구성물.

#### 청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항중 어느 한 항에 있어서, 측정할 항원 또는 헵텐에 대한 항체와 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와의 접합체, 및 측정할 동일한 항원 또는 헵텐에 대한 항체와 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 와의 접합체를 추가로 함유하는 분석용 구성물.

#### 청구항 14

제 1 항 내지 제 12 항중 어느 한 항에 있어서, 측정할 항체에 대한 항원, 햅텐 또는 올리고펩티드와 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 와의 접합체, 및 측정할 동일한 항체에 대한 항원, 햅텐 또는 올리고펩티드와 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 와의 접합체를 추가로 함유하는 분석용 구성물.

#### 청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 기재된 분석물질의 측정용 분석용 구성물 내에서, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 및 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 포함한, 분석물질로부터 유도되어 분석물질을 나타내는 물질을 특이적 결합 페어 2 의 라벨링된 파트너와 접촉시키고, 이를 액체 이동에 의하여 샘플 적용 구역의 하류에 위치한 검출 구역으로 이동시킨 다음, 검출 구역 내에서 특이적 결합 페어 1 의 파트너 1 에 결합시켜, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 1 의 라벨링 물질을 기준으로 측정하는 것을 특징으로 하는, 특이적 결합 페어를 이용한 분석물질의 측정 방법.

#### 청구항 16

제 15 항에 있어서, 분석물질로부터 유도되어 분석물질을 나타내는 물질을 제조하기 위하여 분석물질에 결합하는 항체를 분석물질에 첨가하고, 이때, 항체의 일부는 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 를 지니고, 항체의 다른 일부는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 지니는 방법.

#### 청구항 17

제 15 항에 있어서, 분석물질로부터 유도되어 분석물질을 나타내는 물질을 제조하기 위하여 항원, 햅텐 또는 올리고펩티드를 분석물질에 첨가하고, 이때, 항원, 햅텐 또는 올리고펩티드의 일부는 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 를 지니고, 항원, 햅텐 또는 올리고펩티드의 다른 일부는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 지니는 방법.

#### 청구항 18

제 15 항에 있어서, 분석물질이 핵산이고, 이 핵산을 증폭시킴으로써, 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 결합한, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 또는 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 핵산의 복제물 내로 삽입시키고, 이 증폭 생성물을 핵산 (이 핵산은 이것에 상보적인 핵산이 지니지 않은 결합 페어의 파트너 2 를 지닌다) 과 하이브리드시키는 방법.

#### 청구항 19

제 15 항에 있어서, 분석물질이 핵산이고, 이 핵산을 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 를 지니는 핵산 프로브 및, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 지니는 핵산 프로브의 두 가지 핵산 프로브와 하이브리드시키는 방법.

#### 청구항 20

특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 및 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 파트너, 및 제 1 항 내지 제 14 항중 어느 한 항에 기재된 분석용 구성물을 함유한 분석물질의 측정용 키트.

#### 청구항 21

제 20 항에 있어서, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 및 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 분리된 용기에 함유한 키트.

#### 청구항 22

제 20 항에 있어서, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 및 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 를 하나의 용기에 함께 함유한 키트.

#### 청구항 23

제 20 항 내지 제 22 항중 어느 한 항에 있어서, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 가 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 핵산, 항체, 햅텐 또는 항원 또는 항원을 나타내는 에피토프, 또는 렉틴 또는 리간드 수용체인 키트.

#### 청구항 24

제 23 항에 있어서, 특이적 결합 페어 1 의 파트너 2 가 비오틴인 키트.

#### 청구항 25

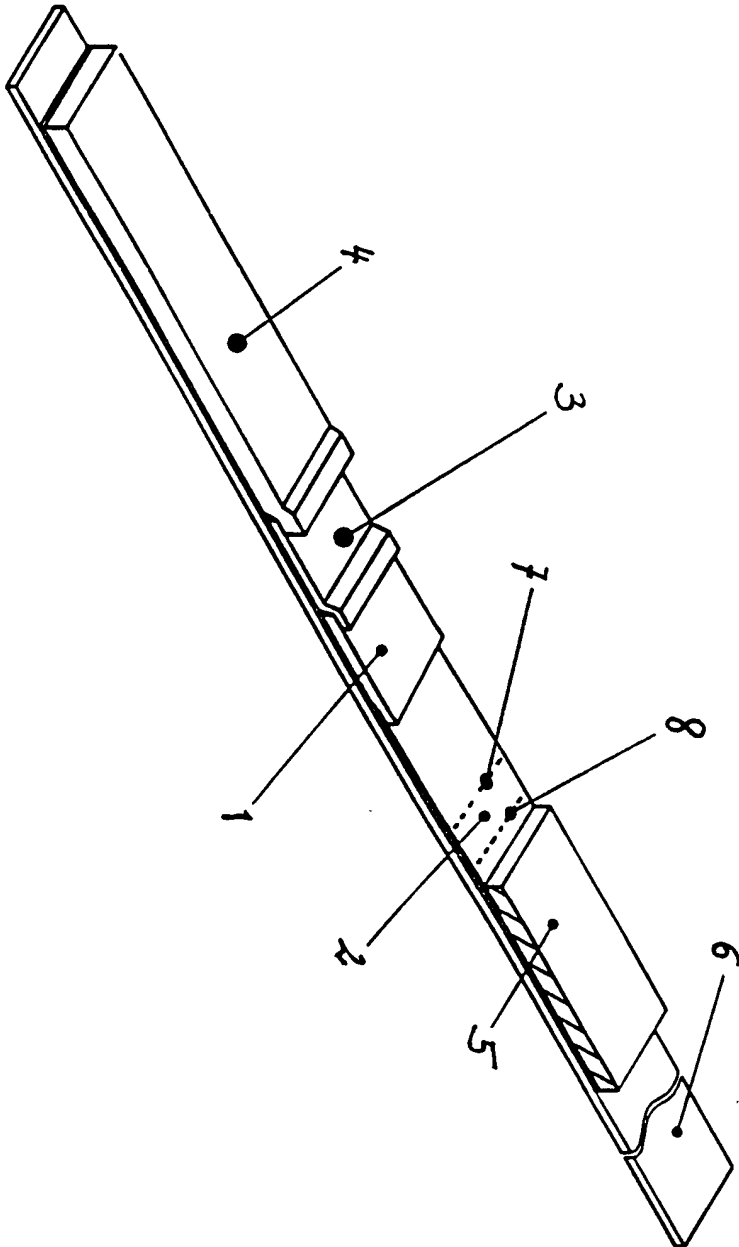
제 20 항 내지 제 22 항중 어느 한 항에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 가 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 핵산, 항체, 햅텐 또는 항원 또는 항원을 나타내는 에피토프, 또는 렉틴 또는 리간드 수용체인 키트.

#### 청구항 26

제 25 항에 있어서, 특이적 결합 페어 2 의 파트너 2 가 햅텐, 바람직하게는 디곡시제닌 또는 디곡신인 키트.

**도면**

도면1



도면2

