

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：02120777

※ 申請日期：92-07-30

※IPC 分類：G01N 33/543

壹、發明名稱：(中文/英文)

以流體力學為基礎的化驗設備及其偵檢方法

FLUIDICS-BASED ASSAY DEVICES

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商・金百利克拉克國際公司

Kimberly-Clark Worldwide, Inc.

代表人：(中文/英文) 羅納德・D・麥克雷依 Ronald D. McCray

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國威斯康辛州 54956 里拿市北湖街 401 號

401 North Lake Street, Neenah 54956, U.S.A.

國 籍：(中文/英文) 美國 USA

參、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 希東・宋 Xuedong Song

2. 羅珊・M・凱洛 Rosann M. Kaylor

3. 尚恩・費斯特 Shawn Feaster

4. 凱元・楊 Kaihuan Yang

住居所地址：(中文/英文)

1. 美國喬治亞州 30076 羅斯威爾市 Roswell, Georgia 30076

2. 美國喬治亞州 30041 康明市 Cumming, Georgia 30041

3. 美國喬治亞州 30097 杜斯拉市 Duluth, Georgia 30097

4. 美國喬治亞州 30040 康明市 Cumming, Georgia 30040

國 籍：(中文/英文) 1-4 美國 USA

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定
之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☒ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國；西元 2002 年 8 月 27 日；10/228,838

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

一般在化驗中運用各種不同分析程序及設備來測定試驗樣本中是否存有分析物。例如，免疫分析(immunoassay)利用免疫系統的機構，其中產生的抗體反應致病或外來有機體的抗原。這些抗體及抗原(即免疫反應)能互相連結，藉以引起高度特定反應機構，此可使用於測定特殊抗原在生物樣本中是否存在或濃度。

【先前技術】

有數個著名的免疫分析方法，此使用標有可看出成分的免疫反應，因此可分析查出分析物。舉例來說，“夾層類型”(sandwich-type)化驗一般牽涉試驗樣本與抗體混合成抗原。這些抗體不定且連接於標籤或碳針，比如染色標籤、膠狀金屬膠質溶液或放射性同位素。然後此混合物與含有固定抗體至分析物之條紋或地區的層析培養基接觸。層析培養基常常是像油量計的條狀形式。當分析物的合成物及標示抗體達到層析培養基上的固定抗體地區時，發生連結，且連結的標示抗體控制於一處。此表示分析物存在。此技術可使用於獲得定量或半定量結果。此夾層類型的一些範例化驗由 Grubb 等人描述於美國專利編號第 4,168,146 號以及 Tom 等人的美國專利編號第 4,366,241 號。

另一技術為“競爭類型”(competitive-type)化驗。在“競爭類型”化驗中，標籤一般為標示分析物或分析物相似體，此為爭奪抗體與任何未標示的樣本分析物連結。競爭化驗一般使用於偵檢分析物(比如半抗原)，每個半抗原為單價，並能夠僅連結一個抗體分子。競爭免疫分析的範例由 Deutsch 等人描述於美國專利編號第 4,235,601 號以及由 Liotta描述於美國專利編號第 4,442,204 號以及 Buechler 等人描述於美國專利編號第 5,208,535 號。

磁性連結化驗已經廣泛使用於生物種類(例如蛋白質、細胞及微生物)自合成樣本分離，因為能夠輕易由磁場操作，且不需獨特或昂貴的儀器。在此方式中，磁性免疫分析可提供快速且簡單的技術，以測定種類是否存在。在此類化驗中，已經使用各種不同信號產生機構，包括顏色(吸收及反射)、螢光、化合光、放射性及酵素。

無論如何，傳統的磁性免疫分析一般需要控制樣本，以每次產生校正曲線，此可使用於獲得分析物的定量資訊。換句話說，當分析試驗樣本內是否有生物種類存在時，多數控制樣本同時做已知種類數量的試驗，以在大約相同狀況中嘗試校正試驗化驗。不幸的是，此校正技術常常不方便、昂貴且令試驗者難以處理。

如此，目前需要有一精確的校正系統，以可輕易控制化驗且較便宜。

【發明內容】

依照本發明的一實施例，以流體力學為基礎的化驗設備(例如毛细管設備)，以查出存於揭發的試驗樣本中的分析物是否存在或數量。設備包含試驗樣本、能夠產生偵檢信號的偵檢探針以及能夠產生校正信號的磁性校正探針。一般而言，偵檢探針及校正探針可由任何材料形成，此可產生一探知信號。舉例來說，在一些實施例中，此探針選自由發色體、催化劑、螢光化合物、化合光化合物、磷光化合物、放射性化合物、直線光標、微脂體及其化合物。例如，偵檢探針及校正探針可為螢光化合物，比如螢光顆粒。在一特別實施例中，偵檢探針為螢光非磁性化合物，且校正探針為螢光磁性顆粒。假使理想的話，螢光磁性顆粒可與特定連結部分結合或阻斷。

通道為與偵檢地區的反應室之流體聯繫。在一實施例中，通道促進溶液流經設備。假使理想的話，隔板可放置於反應室及通道之間，以將

溶液盛裝於反應室內一段時間。舉例來說，在一實施例中，隔板實質上可被溶液分解。此隔板可含有一材料，此材料選自由碳水化合物(例如蔗糖、葡萄糖等等)、鹽類(氯化鈉等等)及其合成物。在另一實施例中，隔板能夠物質破裂。

磁性設備配置鄰接偵檢地區，以自溶液分離偵檢探針及校正探針。舉例來說，在夾層化驗形式的實施例中，在反應室時，偵檢探針及校正探針形成與分析物合成。當置放與偵檢地區中的磁性設備聯繫時，這些分析合成物及任何簡單校正探針自溶液分離。

分離的偵檢及校正探針(合成與/或者簡單)因此可標示分析物在試驗樣本中是否存在或數量。換句話說，試驗樣本內的分析物數量與由分離偵檢探針在偵檢地區產生的偵檢信號強度成比例，此偵檢地區由在偵檢地區分離校正探針(合成與/或者簡單)所產生的校正信號強度校正。舉例來說，在一實施例中，試驗樣本內的分析物數量與偵檢信號的強度(被校正信號分開)成比例。

依照本發明的另一實施例，揭發偵檢存在於試驗樣本中的分析物是否存在或數量的方法。方法包含：

- i. 提供以流體力學為基礎的設備，此設備包含：
 - b) 一反應室，其包含能產生偵檢信號的偵檢探針，以及能產生校正信號的磁性校正探針；
 - c) 一通道，其與偵檢地區的反應室流體聯繫；以及
 - d) 一磁性設備，其配置鄰接偵檢地區；
- ii. 將含有分析物的試驗樣本運用於反應室，以形成一溶液；
- iii. 允許溶液自反應室流至通道的偵檢地區；
- iv. 將偵檢地區中的偵檢探針及校正探針自溶液使用磁性設備分離；

- v. 激發分離的偵檢探針(合成與/或者簡單)與分離的校正探針(合成與/或者簡單)，其中激發作用引起分離的偵檢探針放射偵檢信號，且引起分離的校正探針放射校正信號;
- vi. 測量第一發射波長的偵檢信號強度以及第二發射波長的校正信號強度，第二發射波長可與第一發射波長相同或不同;以及
- vii. 比較偵檢信號與校正信號的強度，其中試驗樣本內的分析物數量與由校正信號強度校正之偵檢信號的強度成比例。

分離的偵檢探針及校正探針可同時或分開產生。同樣地，偵檢信號與校正信號的強度可同時或分開測量。進一步，在一實施例中，方法進一步包含由校正信號強度校正標出偵檢信號強度產生校正曲線，以多數估計分析物濃度。

本發明的其他特性及觀點更詳述探討於下。

【實施方式】

如此處所使用“分析物”(analyte)一詞一般意謂偵檢物質。例如，分析物可包括抗原物質、半抗原、抗體及其化合物。分析物包括(但不受限)毒素、有機化合物、蛋白質、縮氨酸、微生物、氨基酸、核酸、荷爾蒙、類固醇、維他命、藥劑(包括那些施行療效目的以及施行被禁止目的)、細菌、病毒顆粒及代謝物或抗體至上面任何物質。一些分析物的特定範例包括血清蛋白鐵;肌氨酸酐激酶 MIB(CK-MB);digoxin、phenytoin;苯基巴比妥(phenobarbital);carbamazepine;萬古黴素(vancomycin);gentamycin;茶鹼(theophylline);valproic acid;奎尼定(quinidine);leutinizing 荷爾蒙(LH);刺激卵泡素荷爾蒙(FSH);雌二酮、黃體脂酮;IgE 抗體;維他命 B2 微球蛋白;糖化血色素 (glycated hemoglobin, Gly. Hb);皮質醇;洋地黃毒;N-acetylprocainamide(NAPA);procainamide;德國麻疹抗體(比如德國麻疹 IgG 以及德國麻疹 IgM);住血原病蟲抗體(比如住血原病蟲 IgG(Toxo-IgG))

及住血原病蟲 IgM(Toxo-IgM)); 睪丸激素; 水楊酸鹽; 乙醯基氨基苯; B 型肝炎病毒表面抗原(HBsAg); B 型肝炎核心抗原的抗體(比如 B 型肝炎核心抗體 IgG 及 IgM(Anti-HBC)); 人類免疫缺陷病毒 1 及 2(HIV 1 及 2); 人類 T 細胞淋巴瘤病毒 1 及 2(HTLV); B e 型肝炎抗原(HBeAg); B e 型肝炎抗原的抗體(Anti-HBe); 甲狀腺刺激荷爾蒙(TSH); 甲狀腺素(T4); 全部三碘甲狀腺胺酸(triiodothyronine)(Total T3); free 三碘甲狀腺胺酸(Free T3); 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen 簡稱 CEA)以及阿爾發胎兒蛋白(alpha fetal protein, AFP)。濫用及控制物質的藥劑包括(但不受限)安非他命; methamphetamine; 巴比妥酸鹽(比如戊巴比妥、紅中(短效型巴比妥)、戊基巴比妥、苯巴比妥以及巴比妥); 非巴比妥(比如 librium 及 valium); 大麻(cannabinoids)(比如印度大麻葉及大麻煙); 古柯鹼; 吩坦尼(fentanyl); LSD; 白板(methaqualone); 鎮靜劑(比如海洛英、嗎啡、可待因、二氫嗎啡酮(hydromorphone)、氫可酮(hydrocodone)、美沙酮(methadone)、可待因酮(oxycodone)、羥二氫嗎啡酮(Oxymorphone)及鴉片); 環煙六胺以及普帕西芬(propoxyphene)。其他潛在分析物由 Tom 等人描述於美國專利編號第 4,366,241 號。

如此處所使用“試驗樣本”(test sample)一詞一般意謂涉嫌含有分析物的材料。試驗樣本可從出處或接下來的預先處理方式直接使用，以變更樣本特性。試驗樣本可衍生於任何生物來源，比如生理流體(包括血液、唾液、眼球流體、大腦流體、汗、尿液、乳、腹水流體、raucous、滑液、腹膜流體、羊膜流體等等)。試驗樣本在使用之前可預先處理，比如從血液、準備血漿、稀釋黏液等等。處理方法可牽涉過濾、蒸餾、濃縮、阻礙成分的減能作用以及追加試劑。除了生理流體外，為了環境或食物生成化驗的執行，可使用其他液體樣本，比如水、食物生成物等等。另外，可使用涉嫌含有分析物的固態材料做為試驗樣本。在一些實例中，有益於變更固態試驗樣本，以形成液態培養基或分離分析物。

目前將詳細參照各種不同發明實施例，而有一或更多範例發表於下。每個範例經由發明說明提供，並不會對發明有所限制。事實上，顯然那些精通技藝人士在不需違背發明範圍及精神下而可對本發明作各種不同變更及變動。例如，說明或描述部分實施例的特性可使用於其他實施例中，以產生更進一步的實施例。因此，本發明意圖在附加申請專利範圍及其同等物內涵蓋此變更及變動。

一般而言，本發明為針對以流體力學為基礎的化驗設備，以偵檢試驗樣本內的分析物之存在與否或數量。設備利用自行校正磁性連結化驗系統(例如夾層、競爭等等)，此包括可產生偵檢信號(例如螢光非磁性顆粒)的偵檢探針以及可產生校正信號(例如螢光磁性顆粒)的校正探針。試驗樣本內的分析物數量與由校正信號強度校正的偵檢信號強度成比例(例如正比或反比)。已發現本發明以流體力學為基礎的設備提供精確、便宜且可輕易控制測定分析物是否存在於試驗樣本中的方法。

引用第一圖至第二圖，例如，目前將更詳述根據本發明形成以流體力學為基礎的設備(20)。如第一圖所示，如第一圖所示，設備(20)具有一反應室(12)，其與流體通道(14)流體聯繫。雖然反應室(12)及流體通道(14)顯示實際線性關係，將了解到室(12)及通道(14)也可配置於其他關係。進一步，也了解反應室(12)及流體通道(14)可相同或不同。例如，在一實施例中，流體通道及反應室二者可由流體腔定義。

為了發起試驗樣本內的分析物偵檢，可將試驗樣本運用於反應室(12)。或者，試驗樣本可運用於與反應室(12)流體聯繫的抽樣室(無顯示)。為了促進分析物是否存在於試驗樣本內，各種不同偵檢探針(41)也含於反應室(12)內。這些探針(41)剩下可利用於與分析物連結，同時含於反應室(12)內。根據與分析物連結，探針(41)可稍後用於確認分析物是否存在。偵檢探針(41)可使用於偵檢及校正設備(20)。在另一實施例中，無論如何，分開

Fig 8 10

校正探針(43)也可運用於反應室(12)，以與偵檢探針(41)聯合使用，以促進同時校正及偵檢，藉以除去常常由傳統化驗校正系統引起的錯誤。無論如何，將了解偵檢探針(41)與/或者校正探針(43)可一起或分開運用於毛細管流動設備(20)位置。進一步，其他化合物也可添加至反應室(12)，比如促進試劑懸浮或混合。

任何物質一般可產生一信號，此可視覺偵檢，或藉由儀器設備可使用做為偵檢探針(41)與/或者校正探針(43)。各種不同適當物質可包括色素原、催化劑、螢光化合物、化合光化合物、磷光化合物、放射性化合物、直視標籤(包括膠狀金屬(例如金)及非金屬顆粒、染料顆粒、酵素或受酶質或有機聚合乳液顆粒)、微囊 (liposomes)或其他含有信號產生物質的囊胞等等。例如，適合使用做為探針的一些酵素由 Litman 等人描述於美國專利編號第 4,275,149 號，其完全合併於此作為參考目的。酵素/受酶質系統的實例為酵素鹼性活性磷酸酯酶及多酶質硝酸藍色四 -5-溴-4-氯-3-indolyl 磷酸鹽或衍生物或其相似物，或多酶質 4-methylumbelliferyl 磷酸鹽。其他適當探針可由 Jou 等人描述於美國專利編號第 5,670,381 號以及 Tarcha 等人描述於美國專利編號第 5,252,459 號，其完全合併於此作為參考目的。

在一些實施例中，偵檢探針(41)與/或者校正探針(43)可含有產生可探知信號的螢光化合物。螢光化合物可為螢光分子、聚合物、樹枝狀高分子材料(dendrimer)、顆粒等等。例如，適當螢光分子的一些範例包括(但無受限)螢光素、螯化鎘、藻膽蛋白(phycoobiliprotein)、薔薇紅染料及衍生物及相似物。再者，一些商業上可利用的適當螢光顆粒實例包括螢光羧化微粒，此售自 Molecular Probes 有限公司，商標名為“FluoSphere” (Red 580/605)以及“TransfluoSphere” (543/620)及“Texas Red”，以及包括 5-及 6-羧化 4-甲基鹽基桃紅精(carboxytetramethylrhodamine)，此也售自 Molecular Probes 有限公司。

不分使用於添加有信號產生能力的探針之技術，一般理想為偵檢探針(41)與/或者校正探針(43)可為磁性反應探針。一般，假使由磁場應用產生影響的話(比方舉例來說，假使吸引或拒絕或具有探知磁性感受性或感應)，材料考慮“有磁性反應”(magnetically responsive)或“磁性”(magnetic)。例如，可使用於將磁性特性添加至探針之適當磁性反應材料的一些實例包括(但不受限)順磁性材料、超順磁性材料、鐵磁材料、亞鐵磁材料及同磁材料。特定範例為金屬(比如鐵、鎳、鈷、錳等等);稀土屬元素(比如釷、鈾等等);合金(比如鋁、鎳、鈷、銅等等)的磁性合金;氧化物(比如氧化鐵(Fe_3O_4)、氧化亞鐵(Fe_2O_3)、氧化鉻(CrO_2)、氧化鈷(CoO)、氧化鎳(NiO_2)、氧化錳(Mn_2O_3)等等);合成材料(比如鐵酸鹽等等);以及固態溶液(比如具有氧化亞鐵的磁鐵礦等等)。

在一些實施例中，偵檢探針(41)與/或者校正探針探針(43)為螢光及磁性。螢光磁性探針一般為著名的技藝，且常常包括磁性反應構件及螢光構件。在一些實施例中，舉例來說，一或更多螢光染料可運用於磁性顆粒，以形成探針，同時在其他實施例中，螢光染料可運用於非磁性顆粒，此與磁性顆粒結合在一起。適當螢光染料的一些範例包括(但不受限)單次甲基染料、三次甲基染料、五次甲基染料、奎林染料、squaric acid-based 染料等等。一般為吡啶的單次甲基染料具有藍色或藍綠螢光放射物，同時奎林一般具有綠色或黃綠螢光放射物。三次甲基染料實質上朝紅色波長方向移動，同時五次甲基染料甚至進一步移動，常常顯示紅外線螢光放射線。此螢光染料的特定實例包括(但不受限)酞花青、2,3-石腦油花青、squaraines 及 croconic acid 衍生物。適當的螢光磁性顆粒的其他實例相信 Luotola 等人 描述於美國專利編號第 4,731,337 號，以及 Chandler 等人 的美國專利編號第 6,268,222 號，其全部合併於此作為參考目的。

當偵檢探針(41)與/或者校正探針(43)為顆粒時(如上面所述)，微粒

狀探針的平均直徑一般理想下可依照幾個因素(比如顆粒挑選類型、薄膜氣孔大小及薄膜合成物)變化。舉例來說,在一些實施例中,微粒狀探針的平均直徑變化範圍約為 0.01 微米至 1,000 微米,在一些實施例中約為 0.01 微米至 100 微米,且在一些實施例中約為 0.01 微米至 10 微米。在一特別實施例中,微粒狀探針具有約 1 至 2 微米的平均直徑。一般,顆粒實質上為球形,雖然其他形狀(包括(但不受限)盤形、桿形、棒狀、不規則形等等)適合使用於本發明。隨著精通技藝了解到可廣泛變化顆粒的組成、形狀、大小與/或者密度。

偵檢探針(41)與/或者校正探針(43)能夠結合(共價或非共價)或物理吸收分析物。無論如何,在一些方式中,理想下需時常變更探針,因此可輕易連結至分析物。在此實例中,偵檢探針(41)與/或者校正探針(43)可變更某特定結合構件(90a)與/或者(90b)(視第二圖),此可黏著形成探針結合。

特定的連結構件一般表示特定連結組的構件,即二個不同分子,此處其中一化學與/或者物理分子連結至第二分子。例如,免疫反應特定連結構件可包括抗原、半抗原、適合體、抗體及其合成物,包括由重組 DNA 方法或縮氨酸合成形成。抗體可為一單株抗體或多株抗體、重組蛋白質或混合物或其斷片以及抗體與其他特定連結構件的混合物。此抗體及其他適合使用做為特定連結構件的準備細節為著名的精通技藝。

其他共同特定連結組包括(但不限定)生物素及抗生物性蛋白、碳水化合物及親醣蛋白質、補充的核苷酸順序(包括探針及獲得的核酸順序,此使用於 DNA 雜交化驗,以偵檢目標核酸順序)、補充的縮氨酸順序(包括由重組方法、作用器及感受體分子形成)、荷爾蒙及荷爾蒙連結蛋白質、酵素輔因子及酵素、酵素抗化劑及酵素等等。再者,特定的連結組可包括最初特定連結構件的相似物之構件。舉例來說,如果 epitope 至少與分析物相

同的話，可使用分析物的衍生物或斷片(即分析物相似物)。

特定連結構件(90a)與/或者(90b)一般可使用任何各種著名技術而附著至探針(41)與/或者(43)。例如構件(90a)與/或者(90b)特定連結至探針(41)與/或者(43)(例如微顆粒)的共價附件可使用羧基、氨基、乙醛、溴乙醯、碘化醯、硫醇、環氧基及其他反應或連結官能基，以及剩餘自由基及游離基，此可透過蛋白質偶聯反應完成。表面官能基也可合併做為官能共同單體，因為微顆粒的表面可含有極性部分的較高表面濃度。另外，在某情形中，雖然微顆粒探針在合成之後時常功能化，比如多硫酚，微顆粒能與蛋白質直接共價結合，此不需進一步變更。舉例來說，引用第六圖，說明本發明共價結合探針的一實施例。如圖所示，結合的第一步驟為使用碳化二亞胺(carbodiimide)在探針表面上做羧基的催化作用。在第二步驟中，活性羧基與一抗體的氨基反應，以形成一醯胺鍵。催化作用與/或者抗體偶聯可發生於緩衝物中，比如磷酸鹽緩衝鹽(PBS)(例如 pH 7.2)或嗎林乙基磺酸(2[N-morpholino] ethane sulfonic acid)(例如 pH 5.3)。如圖，然後結果探針可乙醇胺堵住，例如形成探針結合。除了共價鍵外，其他附著技術(比如吸附)也可利用於本發明中。

再次引用第一圖，含有分析物的試驗樣本最初可運用於反應室(12)，此處分析物與偵檢探針(41)與/或者校正探針(43)混合。依照選擇的探針類型，分析物與偵檢探針(41)與/或者校正探針(43)連結，以形成合成物(49)(視第二圖)。例如，在一實施例中，含有一分析物的試驗樣本與結合第一連結構件(90a)的(1)螢光非磁性顆粒(41)混合，以及與結合第二連結構件(90b)的(2)螢光磁性顆粒(43)混合。在此一實例中，分析物形成與螢光非磁性顆粒(41)及螢光磁性顆粒(43)夾層的合成物(49)。

雖然不需要，一般理想的是試驗樣本維持於反應室(12)內，長到足以允許合成物(49)形成。因此，在一實施例中，隔板(70)可配置於反應室

(12)及流體通道(14)之間。隔板(70)可控制流體於各種方式中自反應室(12)流至流體通道(14)。舉例來說，在一些實施例中，隔板(70)由實質上在一段時間後溶解於溶液中的材料形成。此可使用於形成隔板(70)之溶解材料的範例包括(但不受限)碳水化合物(例如蔗糖、葡萄糖等等);鹽類(例如氯化鈉)等等。或者，隔板(70)也可為天然屏障，此在一段時間後斷裂或破裂。此天然屏障的範例包括(但不受限)薄膜、箔片、薄矽酮晶片等等。隔板(70)的移動速度(不論以分解還是天然破裂)一般將依照選擇的材料及隔板(70)的幾何學而定。例如，在一些實施例中，隔板(70)在 x 方向的長度範圍約為 1 微米至 1 公分，且在一些實施例中約為 10 微米至 1 毫米。

其他技術也可利用於控制試驗樣本殘留於反應室(12)的時間。舉例來說，隔板(70)可含有一疏水表面，比如發現於聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酸酯、矽彈體等等。在一實施例中，反應室(12)內的探針與/或者分析物的連結將疏水性隔板改變成較親水的地區。疏水性表面產生允許試驗樣本自反應室(12)流至流體通道(14)。因此，一旦隔板(70)已製成親水性，此並不影響流體流經剩餘設備(20)。此疏水性/親水性隔板的範例由 Buechler 等人描述於美國專利編號第 5,885,527 號，其完全合併於此作為參考目的。除了上面所述的時間延遲設備，延遲流體流動的各種不同其他設備也可由 Columbus 描述於美國專利編號第 4,426,451 號;Zuk 等人的美國專利編號第 4,435,504 號;Valkirs 等人的美國專利編號第 4,727,019 號;Ullman 等人的美國專利編號第 4,857,453 號;Devaney Jr. 等人的美國專利編號第 4,877,586 號;Brown III 等人的美國專利編號第 4,916,056 號;以及 Hillman 等人的美國專利編號第 4,963,498 號。

在室(12)內充分反應時間之後，合成物(49)及任何未連結探針(41)與/或者(43)然後可移經流體通道(14)至偵檢地區(31)。假使理想的話，可選擇流體通道(14)的幾何學，因此毛細管力量幫助試驗樣本自反應室(12)流至

流體通道(14)。舉例來說，在一些實施例中，流體通道(14)在 y 方向的寬度約為 1 微米至 5 公分，且在一些實施例中約為 50 微米至 500 微米。進一步，流體通道(14)在 x 方向的長度範圍約為 1 毫米至 50 公分，且在一些實施例中約為 10 毫米至 50 毫米。流體通道(14)在 z 方向的高度約為 0.1 微米至 50 毫米，且在一些實施例中約為 5 微米至 500 微米。

在偵檢地區(31)中，然後合成物(49)及任何未連結結合的螢光磁性顆粒(43)以磁性設備(60)捕獲，並使用傳統技術自樣本架分離。例如，磁場產生器可使用於產生磁場，此自磁性反應探針誘出反應。適當的磁場產生器包括(但不受限)持久磁鐵及電磁石。磁性分離作用一般牽涉樣本與磁性顆粒混合於液態培養基中，以藉由親和力反應連結分析物，然後運用磁場自樣本培養基分離出未連結的磁性顆粒及分析合成物。大部分而言，假使並非所有為磁性顆粒，除了膠狀。因此，可攪動培養基，以使顆粒懸浮保持一段時間，以允許發生生物親和性連結反應。已知攪動方法的範例包括搖動、旋轉、擺動、迴轉或相似操縱部分盛滿的容器。一些商業上適當磁性分離設備的可利用範例包括由 Dynal 有限公司(紐約成功湖)製造的 Dynal MPC 系列分離器，此在容器外部使用持久性磁鐵，以固定試驗培養基，並僅提供分離。在試驗培養基個別完成磁性顆粒混合，以做親和力反應。另外，捕獲磁性顆粒的其他方法可由 Liberti 等人描述於美國專利編號第 5,200,084 號;Tuunanen 等人描述於美國專利編號第 5,647,994 號;Wang 等人描述於美國專利編號第 5,795,470 號;以及由 Siddiqi描述於美國專利編號第 6,033,574 號，其完全合併於此作為參考目的。

一旦捕獲，螢光磁性顆粒(43)(合成及未合成)及合成物(49)的螢光信號可使用傳統技術測量。舉例來說，在一實施例中，顆粒(43)及合成物(49)可由相同外部能量激發。在此實施例中，能量於激發波長中運用放射線，藉以引起顆粒(43)在與由合成物(49)放射不同波長下的波長中放射光

線。此能個別測量合成物(49)及顆粒(41)。或者，顆粒(43)及合成物(49)也可個別使用分離外部能量來測量。

一般而言，螢光的結果為在某螢光化合物中發生三階段作用。在第一階段中，能量由外部能量(比如白熱燈或雷射)供給，並由螢光化合物吸收，此產生一激發的電子單態(singlet state)。在第二階段，激發狀態在螢光化合物歷經構形變化期間有限時，並加入多數可能與本身分子環境互相影響。此時期，部分散發激發狀態的能量，自螢光放射開始產生激發狀態。第三階段為螢光放射階段，其中放射能量，使螢光化合物回到本身基態。放射能量比本身激發能量(光或雷射)低，因此波長較長。此轉移或能量或波長的不同能發現放射能量，並自激發能量分離。

螢光偵檢一般利用波長過濾，以自激發光子分離放射光子，且真查器紀錄放射光子，並產生可紀錄輸出，通常作為一電子信號或一攝影影像。一般有四個公認的偵查器類型：光譜螢光計及全自動微盤分析儀(microplate reader); 螢光顯微鏡; 螢光掃描器以及流式螢光儀(Flow cytometer)。適合使用於本發明的螢光偵查器為 FluoroLog III 光譜螢光計，此售自新澤西州 Edison 的 SPEX 產業有限公司。

雖然並不需要，尤其理想偵檢及校正探針組的選擇基準包括：(1) 少許或沒有光譜重疊，以吸收光譜或螢光光譜，因此可個別測量放射強度;(2) 當造成極接近時，在偵檢及校正探針之間沒有顯著螢光能量轉移，因此獨立放射; 以及(3) 較長放射波長(例如約大於 600 nm)，因此生物流體的自動螢光對螢光測量有最小影響。舉例來說，第七圖說明具有少數重疊之激發光譜的示範校正探針及偵檢探針，因此可獨立激發。

進一步，假使理想的話，如“時間解析螢光偵檢”(time-resolved fluorescence detection)也可利用於本發明中。時間解析螢光偵檢設計成減少放射能量或散布作用的背景信號(此由激發放射線散布所引起)，此乃利用

某螢光材料的螢光特徵優點，比如鈰(Eu (III))及鈿(Tb(III))的稀土屬螯合物。此螯合物可在螯合物於較短波長中激發之後顯示強烈紅移窄頻耐久放射。一般，螯合物具有強的紫外線吸收波帶，此乃由於色基位於緊靠分子中的稀土屬。隨後以色基做光吸收，激發能例可自激發色基轉移至稀土屬。此隨著稀土屬的螢光放射特徵。使用與窄頻放射過濾器結合的脈波激發及時閘偵檢僅允許自稀土屬螯合物做特定螢光偵檢，此一般自存於較短壽命或具有較短波長放射之樣本中的其他種類排拒放射物。測量螢光的其他 time-resolved 技術由 Davidson 描述於美國專利編號第 5,585,279 號，以及 Hemmila 等人 的美國專利編號第 5,637,509 號，其完全合併於此作為參考目的。

不分使用於測量螢光的技術，分析物的絕對數量可由比較捕獲螢光非磁性顆粒(41)與捕獲螢光磁性顆粒(43)來確定。捕獲螢光非磁性顆粒(41)的螢光強度 I_s 可與捕獲螢光磁性顆粒(43)的螢光強度 I_c 比較。估計並知悉捕獲螢光磁性顆粒(43)的總數量，因此可使用校正目的。舉例來說，在一實施例中，分析物的數量直接與 I_s/I_c 比成正比。根據偵檢地區(31)劃入的範圍，可測定分析物的一般濃度範圍。結果，校正及樣本試驗可在相同時間於大約相同情況下傳導，因此隨著增加靈敏度而提供確實定量或半定量結果。

假使理想的話，為了知分析物濃度的範圍，可標出 I_s/I_c 比率對分析物濃度，以產生一校正曲線。為了測定未知試驗樣本中的分析物數量，然後根據校正曲線，信號比例可轉變成分析物濃度。需注意合成及未合成之螢光磁性顆粒的捕獲效率對任何給予的樣本為相同的。因此，捕獲效率中的變化不相信顯著妨礙樣本間的結果，因為螢光強度的比率(即 I_s/I_c)使用於替代絕對螢光。也須注意可標出 I_s 與 I_c 之間的另一數學關係，以產生校正曲線。舉例來說，在一實施例中，可標出 $I_s/(I_s+I_c)$ 值對分析物濃度，以

產生校正曲線。

再次引用第一圖，不在偵檢地區(31)化合的任何探針或合成物沿流體通道(14)延續直到遇到芯吸襯墊，並積聚。雖然並不需要，芯吸襯墊(28)可幫助促進毛細管現象，且流體疏經設備(20)。可使用於形成芯吸襯墊(28)的一些適當材料包括(但不受限)硝化纖維素、纖維素、多孔聚乙烯襯墊極玻璃纖維濾紙。

本發明也考慮各種不同其他實施例。例如，引用第三圖，上面描述並說明於第一圖的設備(20)可變更形成另一形式的夾層化驗。例如，在一實施例中，含有分析物的試驗樣本最初可與結合第一連結構件(190a)的(1)螢光非磁性顆粒(141a)混合，與螢光磁性顆粒(143)混合，以及與結合第二連結構件(190b)的(3)非螢光磁性顆粒(141b)混合。在此特殊實施例中，螢光磁性顆粒(143)可用阻斷劑(blocking agent)(比如 β -酪蛋白)阻斷，以阻止非特定物連結至分析物，藉以允許此類顆粒(143)僅充當一校正探針。進一步，第一特定連結構件(190a)及第二特定連結構件(190b)可為相似分析物。

如此處所使用“阻斷劑”(blocking agent)一詞意謂黏著至探針表面的試劑，因此“阻斷”或阻止非分析物材料連結至表面。阻斷劑可包括(但不受限) β -酪蛋白、白蛋白(比如血清蛋白(Bovine Serum Albumin))、pluronic 或其他表面活化劑、多甘醇、聚乙烯醇或上面化合物的硫磺衍生物以及一般精通技藝熟知的任何其他阻斷材料。

再度引用第三圖，分析物形成與結合螢光非磁性顆粒(141a)及結合非螢光磁性顆粒(141b)夾層的合成物(149)。合成物(149)可從反應室(12)移往流體通道(14)內的偵檢地區(31)。在偵檢地區(31)，然後合成物(149)與任何未連結顆粒(143)與/或者(141b)被磁性設備(60)捕獲，並自剩餘樣本分離。如上所述，分析物的絕對數量可藉由比較捕獲螢光非磁性顆粒(141a)的螢光強度(I_s)及捕獲螢光磁性顆粒(143)的螢光強度(I_c)來斷定。尤其，估

計且明白捕獲螢光磁性顆粒(143)，因此可使用作為校正目的。因此，在此實施例中的分析物數量與 I_s/I_c 比率成正比。

再者，引用第四圖，描述於上面及說明於第一圖的設備(20)也可變更，以形成競爭化驗。在一實施例中，例如，含有一分析物的試驗樣本最初可與結合第一連結構件(290a)的(1)螢光非磁性顆粒(241)混合，以及與結合第二連結構件(290b)的(2)螢光磁性顆粒(243)混合。在此特別實施例中，第一連結構件(290a)可與分析物完全相同，同時第二連結構件(290b)可為分析物的相似物。

根據混合，對結合的螢光磁性顆粒(243)而言，分析物與結合的螢光非磁性顆粒(241)競爭，使得形成分析物及螢光磁性顆粒(243)的合成物以及螢光磁性顆粒(243)及螢光非磁性顆粒(241)的合成物。合成物(249a)及(249b)可自反應室(12)移往流體通道(14)中的偵檢地區(31)。在偵檢地區(31)中，然後合成物(249a)及(249b)以及任何非連結顆粒(243)以磁性設備(60)捕獲，並自剩餘樣本分離。如上所述，分析物的絕對數量可藉由比較捕獲螢光非磁性顆粒(241)的螢光強度 I_s 及捕獲合成或非合成螢光磁性顆粒(243)的螢光強度 I_c 來確定。尤其，估計且明白捕獲螢光磁性顆粒(243)的總數量，且因此可使用作為校正目的。因此，在此實施例中的分析物數量與 I_s 與 I_c 的比率成反比。

引用第五圖，也可變更上面所述及說明於第一圖的設備(20)，以形成競爭化驗的另一形式。在一實施例中，例如，含有一分析物的試驗樣本最初可與結合第一連結構件(390a)的(1)螢光非磁性顆粒(341)混合，與結合第二連結構件(390a)的(2)螢光磁性顆粒(343)混合，以及與結合地案連結構件(390b)的(3)非螢光磁性顆粒(341b)混合。在此特別實施例中，第一連結構件(390a)可與分析物完全相同，同時第二連結構件(390b)可為分析物的相似物。進一步，螢光磁性顆粒(343)可用阻斷劑(比如 β -酪蛋白)阻塞，以

一些實施例中，偵檢與/或者校正探針可為化合光或磷光化合物。例如，化合光探針可經由使用適當作用物作為著名技藝而激發。本發明也考慮其他實施例及形狀。

本發明發現本發明的流體化驗設備可利用於操縱磁性探針及分析物的創立準備與偵檢。換句話說，磁性準備及偵檢技術(例如螢光)成為合併系統。進一步，此系統自行校正，以在使用傳統外部校正技術時除去控制校正的需要。在一實施例中，自行校正可經由使用螢光磁性探針完成。從螢光磁性探針及螢光非磁性探針放射的螢光可在相同樣本上分開測量。因為估計磁性顆粒的數目，當測定捕獲螢光非磁性探針及之後分析物的數量時，可自行校正系統。再者，因為在相同情形下，校正及偵檢探針可同時測量，避免潛在干涉許多變化(比如溫度及儀器不穩定)，以改善偵檢可靠性及一致性。

本發明可參照下面範例做進一步了解。

範例 1

說明使用夾層化驗(比如第三圖所示)偵檢分析物存在的技巧。最初，將下面成分加入六個 Eppendorf 玻璃瓶：

- (1) 25 微升的共價結合非螢光磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中為每毫升有 3 毫克);
- (2) 15 微升的共價結合螢光非磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中為每毫升有 2 毫克);
- (3) 10 微升以 β -酪蛋白阻斷的螢光磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中為每毫升有 3 毫克);
- (4) leutinizing 荷爾蒙(LH)分析物，範圍為 0、10 微升(1 mg/ml)、20(1 mg/ml)、40 微升(1 mg/ml)、10 微升(2 mg/ml)以及 8010 微升

(2mg/ml)。

隨著每個 Eppendorf 玻璃瓶，將適當數量的 PBS 緩衝物加入最後容量為 150 微升。這些樣本在室溫下培養，輕微搖晃 10 分鐘。然後磁性顆粒以獲自 Dynal 有限公司的磁性分離器分離。從玻璃瓶丟棄浮在表層的東西，且將磁性顆粒再懸浮於 1.5 公撮的 PBS 中。300 微升的螢光磁性顆粒懸浮液使用於每個螢光測量。“Flourollog III 光譜螢光計”(Flourollog III Spectrofluorometer)(獲自新澤西州 Edison 的 SPEX 製造業)使用直角放置模式測量樣本的螢光。470 nm 的激發波長以及 560 nm 的放射波長用於螢光磁性顆粒，同時 570 nm 的激發波長以及 605 nm 的放射波長用於螢光非磁性顆粒。整合時間為 0.2 秒。

第八圖顯示在每個樣本中的標準及校正螢光密度，此作為 LH 服用量的函數。標準強度由測量樣本的螢光強度除以控制樣本的螢光強度得到。控制樣本為無分析物的樣本。

使用於範例 1 的顆粒如下形成：

非螢光磁性顆粒

125 微升的 10%羧化物變更順磁性顆粒(0.35 微米，Estapor®超順磁性微球體，此獲自 Bang's Laboratories 有限公司)以 1.5 公撮的羧化物緩衝物清洗一次，並以 PBS 使用磁性分離器清洗二次。清洗顆粒懸浮於 0.6 公撮的 PBS 及 15 毫克的碳化二亞胺(來自 Polysciences 有限公司)。混合物允許在室溫(RT)下於攪拌器反應 30 分鐘。然後活性化顆粒以硼酸鹽緩衝物清洗二次。活性化顆粒再次懸浮於 1.2 公撮的硼酸鹽緩衝物中。之後，30 微升的 LH β -單株抗體(9.8 mg/ml，獲自 Fitzgerald Industries International 有限公司)加入活性化顆粒。反應混合物允許在室溫下於攪拌器上反應整晚。然後在緩慢搖動 15 分鐘下，於 1 公撮的 0.1 莫耳乙醇胺中收集及培養活性化顆粒。然後顆粒以 PBS 清洗二次，並在 4°C 下儲存於緩衝物中，緩

衝物含有 0.1 莫耳的 PBS、0.15 莫耳的 NaCl、1%的 β -酪蛋白、5%甘油以及 0.1%的 NaN_3 。

螢光非磁性顆粒

“螢光非磁性”顆粒為根據上面所述的程序之共價結合，除了連結構件為 LH α -單株抗體(9.8 毫克/公撮，獲自 Fitzgerald Industries International 有限公司)替代 LH β -單株抗體。利用的顆粒為 FluoSpheres® 羧化物變更微球體，此獲自 Molecular Probes 有限公司。顆粒具有 0.5 微米的粒徑，且為具有 580 nm 的激發波長及 605 nm 的放射波長之紅色螢光。

螢光磁性顆粒

100 微升的 2.76%超順磁性顆粒之固態懸浮液(獲自賓夕凡尼亞州瓦林頓的 Polysciences 有限公司)在 Eppendorf 管中與 1 公撮硼酸鹽緩衝物(0.1 莫耳，pH=8.5)結合。此顆粒的平均直徑為 1~2 微米，且相信含有微球體的鐵具有一聚苯乙烯表面，此允許消極吸附，且官能基與蛋白質反應。顆粒以磁性分離器(獲自 Dynal 有限公司)分離，且於 0.1 莫耳硼酸鹽緩衝物中，再次懸浮於 200 微升的 10 毫克/公撮之 β -酪蛋白。懸浮液以緩慢混合 30 分鐘形成。重複上面的步驟二次。分離顆粒再次懸浮於 200 微升的 PBS 中，並儲存於 4°C 中。

Leutinizing 賀爾蒙(LH)

“leutinizing 賀爾蒙(LH)”(leutinizing hormone)獲自 Fitzgerald Industries International 有限公司。

範例 2

說明使用夾層化驗(比如第二圖所示)偵檢的能力。最初，將下面成分加入六個 Eppendorf 玻璃瓶：

- (1) 5 微升的共價結合螢光非磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中有 2 毫克/公撮);
- (2) 15 微升的物理吸收共價結合螢光磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中有 3 毫克/公撮);以及
- (3) Leutinizing 賀爾蒙(LH)分析物範圍為 0、5、10 微升、20、40 及 100 微升($2\mu\text{g/ml}$)。

隨著 Eppendorf 玻璃瓶，將適當數量的 PBS 緩衝物加入最後容積 150 微升。樣本在室溫下以輕微搖動 25 分鐘形成。然後磁性顆粒以磁性分離器(獲自 Dynal 有限公司)分離。從玻璃瓶丟棄浮在表層的東西，且將磁性顆粒再懸浮於 1.5 公撮的 PBS 中。300 微升的螢光磁性顆粒懸浮液使用於每個螢光測量。“Flouorolog III 光譜螢光計”(Flouorolog III Spectrofluorometer)(獲自新澤西州 Edison 的 SPEX 製造業)使用直角放置模式測量樣本的螢光。470 nm 的激發波長以及 560 nm 的放射波長用於螢光磁性顆粒，同時 570 nm 的激發波長以及 605 nm 的放射波長用於螢光非磁性顆粒。整合時間為 0.2 至 1 秒。

第八圖顯示在每個樣本中的標準及校正螢光密度，此作為 LH 服用量的函數。

形成使用於範例 2 的顆粒，如下：

螢光非磁性顆粒

“螢光非磁性”(fluorescent non-magnetic)顆粒如上面所述的範例 1 所形成。

螢光磁性顆粒

2.76 毫克的螢光高順磁性顆粒(在水溶性懸浮液中有 2.5% 的固體) 獲自賓夕凡尼亞州瓦林頓的 Polysciences 有限公司。顆粒以硼酸鹽緩衝物清洗三次，並以磁性分離器(獲自 Dynal 有限公司)分離。清洗顆粒可再次懸浮於 200 微升的硼酸鹽緩衝物中，並加入 82 微克的 β -leutinizing 賀爾蒙(β -LH)單株抗體(1 毫克/公撮，獲自 Fitzgerald Industries International 有限公司)。混合物在室溫下緩慢搖動整晚。然後以磁性分離器收集混合物，並以 200 微升的 β -酪蛋白(在硼酸鹽緩衝物中有 10 毫克/公撮)緩慢混合 30 分鐘形成，以阻斷非特定的連結地區。阻斷顆粒以 PBS 清洗二次，並儲存於 0.1 莫耳的 PBS 中。

Leutinizing 賀爾蒙(LH)

“leutinizing 賀爾蒙(LH)”獲自 Fitzgerald Industries International 有限公司。

範例 3

自行校正的磁性連結化驗與非校正的磁性連結化驗比較。

沒有自行校正

最初，下面成分加入 5 個 Eppendorf 玻璃瓶(表 I 中的玻璃瓶編號為 2~6)：

- (1) 15 微升的共價結合非螢光磁性顆粒(在 0.1 莫耳 PBS 緩衝物中有 3 毫克/公撮);
- (2) 15 微升的共價結合螢光非磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中有 2 毫克/公撮);
- (3) 20 微升的 leutinizing 賀爾蒙(LH)分析物(1 微克/公撮);以及
- (4) 20 微升的 PBS。

僅以 20 微升的 PBS(表 I 中的玻璃瓶編號為 1)形成控制 Eppendorf 玻璃瓶。

這些樣本在室溫下以緩慢搖動 20 分鐘而形成。然後磁性顆粒以磁性分離器(獲自 Dynal 有限公司)分離。從玻璃瓶丟棄浮在表層的東西，且將磁性顆粒再懸浮於 1.5 公撮的 PBS 中。300 微升的螢光磁性顆粒懸浮液使用於每個螢光測量。“Flouorolog III 光譜螢光計”(Flouorolog III Spectrofluorometer)(獲自新澤西州 Edison 的 SPEX 製造業)使用直角放置模式測量樣本的螢光。570 nm 的激發波長以及 605 nm 的放射波長用於不同天對螢光的測量。

表 I 列出每天的相關螢光數據。

表 I：螢光測量

玻璃瓶	1	2	3	4	5	6	標準誤 差%
第 1 天	13	254	215	263	285	291	11
第 2 天	12	235	207	300	263	299	15
第 3 天	12	183	176	213	270	266	20
第 4 天	18	265	226	275	282	293	10
第 5 天	9	207	193	246	236	244	10
第 6 天	14	227	202	252	262	274	12
標準誤 差%	23	13	13	11	6	7	

自行校正

最初，下面成分加入 5 個 Eppendorf 玻璃瓶(表 II 中的玻璃瓶編號

為 9~13)：

- (1) 15 微升的共價結合非螢光磁性顆粒(在 0.1 莫耳 PBS 緩衝物中有 3 毫克/公撮);
- (2) 15 微升的共價結合螢光非磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中有 2 毫克/公撮);
- (3) 20 微升的螢光磁性顆粒，此以 β -酪蛋白(在 PBS 緩衝物中有 3 毫克/公撮)阻斷;以及
- (4) 20 微升的 leutinizing 賀爾蒙(LH)分析物(1 微克/公撮);以及
- (5) 20 微升的 PBS。

僅以 20 微升的 PBS(表 II 中的玻璃瓶編號為 8)形成控制 Eppendorf 玻璃瓶。

這些樣本在室溫下以緩慢搖動 20 分鐘而形成。然後磁性顆粒以磁性分離器(獲自 Dynal 有限公司)分離。從玻璃瓶丟棄浮在表層的東西，且將磁性顆粒再懸浮於 1.5 公撮的 PBS 中。300 微升的螢光磁性顆粒懸浮液使用於每個螢光測量。“Flourollog III 光譜螢光計”(Flourollog III Spectrofluorometer)(獲自新澤西州 Edison 的 SPEX 製造業)使用直角放置模式測量樣本的螢光。470 nm 的激發波長以及 560 nm 的放射波長用於螢光磁性顆粒，570 nm 的激發波長以及 605 nm 的放射波長用於不同天對螢光的測量。表 II 列出每天的相關螢光數據。

表 II：螢光測量

玻璃瓶	8	9	10	11	12	13	標準誤 差%
第 1 天	31/32	352/47	344/43	300/41	318/44	369/39	12
第 2 天	31/42	324/42	329/41	323/46	338/47	418/43	14
第 3 天	28/39	307/40	333/42	282/42	288/40	425/46	12

第 4 天	30/41	267/36	292/36	271/41	281/38	356/43	8.8
第 5 天	21/29	252/33	292/34	258/38	275/36	328/37	10
第 6 天	21/25	237/33	307/38	265/40	288/35	358/39	12
標準誤 差%	13	3	3	4	5	6	

如由二系統的每組樣本比較下看出，自行校正系統的標準誤差顯著小於沒有自行校正的標準誤差，即使在謹慎控制狀況下。因為自行校正系統較少依照測量狀況，當沒有謹慎控制狀況時，預料自行校正系統的標準誤差甚至小於沒有自行校正系統的標準誤差。

形成使用於範例 3 的顆粒，如下：

非螢光磁性顆粒

“非螢光磁性”(non-fluorescent magnetic)顆粒由上面所述於範例 1 中形成。

螢光非磁性顆粒

“螢光非磁性”(fluorescent non-magnetic)顆粒由上面所述於範例 1 中形成。

螢光磁性顆粒

“螢光磁性顆粒”(fluorescent magnetic particles)由描述於範例 2 中形成。

Leutinizing 賀爾蒙(LH)

“leutinizing 賀爾蒙(LH)”獲自 Fitzgerald Industries International 有限公司。

範例 4

說明使用夾層化驗(比如第三圖所示)偵檢分析物存在的技巧。最初，將下面成分加入六個 Eppendorf 玻璃瓶：

- (1) 30 微升的共價結合非螢光磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中為每毫升有 2 毫克);
- (2) 20 微升的共價結合螢光非磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中為每毫升有 2 毫克);
- (3) 15 微升以 β -酪蛋白阻斷的螢光磁性顆粒(在 PBS 緩衝物中為每毫升有 1 毫克);
- (4) C 反應蛋白質(CRP)分析物，範圍為 0、5、10、20、50 及 100 微升(在 PBS 中為 0.2 微克/公撮)。

這些樣本在室溫下以輕微搖晃 20 分鐘形成。然後磁性顆粒以獲自 Dynal 有限公司的磁性分離器分離。從玻璃瓶丟棄浮在表層的東西，且將磁性顆粒再懸浮於 1.5 公撮的 PBS 中。300 微升的螢光磁性顆粒懸浮液使用於每個螢光測量。“Flouorolog III 光譜螢光計”(Flouorolog III Spectrofluorometer)(獲自新澤西州 Edison 的 SPEX 製造業)使用直角放置模式測量樣本的螢光。470 nm 的激發波長以及 560 nm 的放射波長用於螢光磁性顆粒，同時 570 nm 的激發波長以及 605 nm 的放射波長用於螢光非磁性顆粒。整合時間為 0.2 至 1 秒。第十圖顯示在每個樣本中的標準及校正螢光密度，此作為 CRP 服用量的函數。

形成使用於範例 4 中的顆粒，如下：

非螢光磁性顆粒

125 微升的 10%羧化物變更順磁性顆粒(0.35 微米, Estapor®超順磁性微球體, 此獲自 Bang's Laboratories 有限公司)以 1.5 公撮的羧化物緩衝物清洗一次, 並以 PBS 使用磁性分離器清洗二次。清洗顆粒懸浮於 0.6 公撮的 PBS 及 15 毫克的碳化二亞胺(來自 Polysciences 有限公司)。混合物允許在室溫(RT)下於攪拌器反應 30 分鐘。然後活性化顆粒以硼酸鹽緩衝物清洗二次。活性化顆粒再次懸浮於 1.2 公撮的硼酸鹽緩衝物中。之後, 30 微升的抗 C 反應蛋白質(抗 CRP-1)單株抗體(Mab A5804, 2 mg/ml, 獲自 BiosPacifc 有限公司)加入活性化顆粒。反應混合物允許在室溫下於攪拌器上反應整晚。然後收集活性化顆粒, 並在緩慢搖動 15 分鐘下, 於 1 公撮的 0.1 莫耳乙醇胺中收集及形成活性化顆粒。然後顆粒以 PBS 清洗二次, 並在 4°C 下儲存於緩衝物中, 緩衝物含有 0.1 莫耳的 PBS、0.15 莫耳的 NaCl、1%的 β -酪蛋白、5%甘油以及 0.1%的 NaN_3 。

螢光非磁性顆粒

“螢光非磁性”(fluorescent non-magnetic)顆粒根據上面所述的程序共價結合, 除了連結材料為抗 C-反應蛋白質(抗-CRP2)單株抗體(2 mg/ml, 獲自 BiosPacifc 有限公司)替代抗-CRP1。利用的顆粒為 FluoSpheres®羧化物變更微球體, 此獲自 Molecular Probes 有限公司。顆粒具有 0.5 微米的粒徑, 且為具有 580 nm 的激發波長及 605 nm 的放射波長之紅色螢光。

螢光磁性顆粒

100 微升的 2.76%超順磁性顆粒之固態懸浮液(獲自賓夕凡尼亞州瓦林頓的 Polysciences 有限公司)在 Eppendorf 管中與 1 公撮硼酸鹽緩衝物

(0.1 莫耳，pH=8.5)結合。此顆粒的平均直徑為 1~2 微米，且相信含有微球體的鐵具有一聚苯乙烯表面，此允許消極吸附，且官能基與蛋白質反應。然後 1 公撮硼酸鹽緩衝物(0.1 莫耳，pH=8.5)加入 Eppendorf 管中的顆粒。顆粒以磁性分離器(獲自 Dynal 有限公司)分離，且於 0.1 莫耳硼酸鹽緩衝物中，再次懸浮於 200 微升的 10 毫克/公撮之 β -酪蛋白。懸浮液以緩慢混合 30 分鐘形成。重複上面的步驟二次。分離顆粒再次懸浮於 200 微升的 PBS 中，並儲存於 4°C 中。

C 反應蛋白質(CRP)

“C-反應蛋白質(CRP)”獲自 BiosPacific 有限公司。

儘管發明已詳述於特定實施例中，將明白依獲得對前文的了解，認為精通的技藝對這些實施例可輕易做變更及同等物。因此，本發明的範圍將評估作為附加申請專利範圍及其任何同等物。

【圖式簡單說明】

本發明的全部及授權揭發(包括針對一般精通技藝的最佳模式)尤其更發表於剩餘的發明書中，此可參照附圖，如下：

第一圖為本發明以流體力學為基礎設備的實施例之立體圖；

第二圖為本發明使用於夾層化驗形式之實施例的機構圖解實例；

第三圖為本發明使用於夾層化驗形式之另一實施例的機構圖解實例；

第四圖為本發明使用於競爭化驗形式之一實施例的機構圖解實例；

第五圖為本發明使用於競爭化驗形式之另一實施例的機構圖解實例；

第六圖為共價結合抗體至醯胺微粒的一實施例之圖解實例；

第七圖顯示依照本發明的一實施例的校正探針(C)及偵檢探針(FP)之激發(EX)及發射(EM)光譜;

第八圖顯示標準螢光強度與 leutinizing 荷爾蒙(LH)(討論於範例 1)數量的比較;

第九圖顯示標準螢光強度與 leutinizing 荷爾蒙(LH)(討論於範例 2)數量的比較;

第十圖顯示標準螢光強度與 C-反應蛋白質(CRP)(討論於範例 4)數量的比較;

重複使用本說明書及圖示的參考特性，此意圖表示發明的相同或類似特性或構件。

【圖式元件簡單說明】

12	reaction chamber	反應室
14	fluidic channel	流體通道
20	fluidic-based device	以流體力學為基礎的設備
28	wicking pad	芯吸襯墊
31	detection zone	偵檢地區
41	detection probe	偵檢探針
43	calibration probe	校正探針
49	complex	合成物
60	magnetic device	磁性設備
70	barrier	隔板
90a	first binding member	第一連結構件
90b	second binding member	第二連結構件
141a	fluorescent non-magnetic particle	螢光非磁性顆粒
143	fluorescent magnetic particle	螢光磁性顆粒

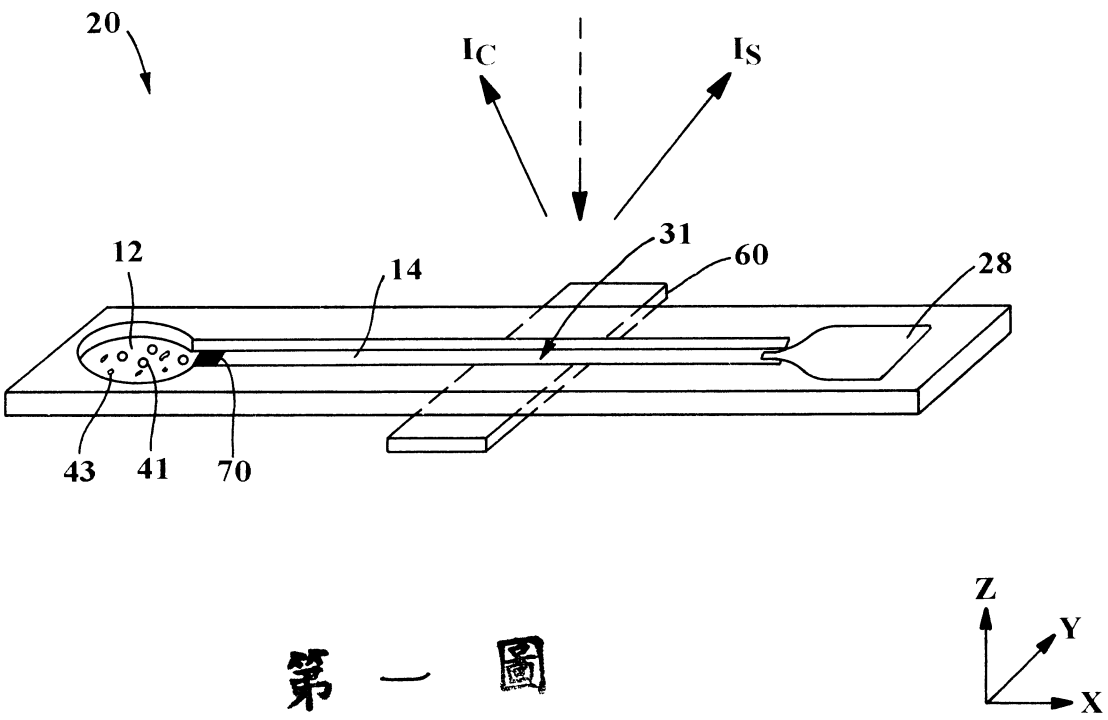
190a	first specific binding member	第一特定連結構件
190b	second specific binding member	第二特定連結構件
241	fluorescent non-magnetic particle	螢光非磁性顆粒
243	fluorescent magnetic particle	螢光磁性顆粒
249a	complex	合成物
249b	complex	合成物
290a	first binding member	第一連結構件
290b	second binding member	第二連結構件
341a	fluorescent non-magnetic particle	螢光非磁性顆粒
341b	non-fluorescent non-magnetic particle	非螢光磁性顆粒
343	unbound particle	非連結顆粒
349a	fluorescent non-magnetic particle	螢光非磁性顆粒
349b	fluorescent non-magnetic particle	螢光非磁性顆粒
390a	first binding member	第一連結構件
390b	second binding member	第二連結構件

伍、中文發明摘要：以流體力學為基礎的化驗設備及其偵檢方法

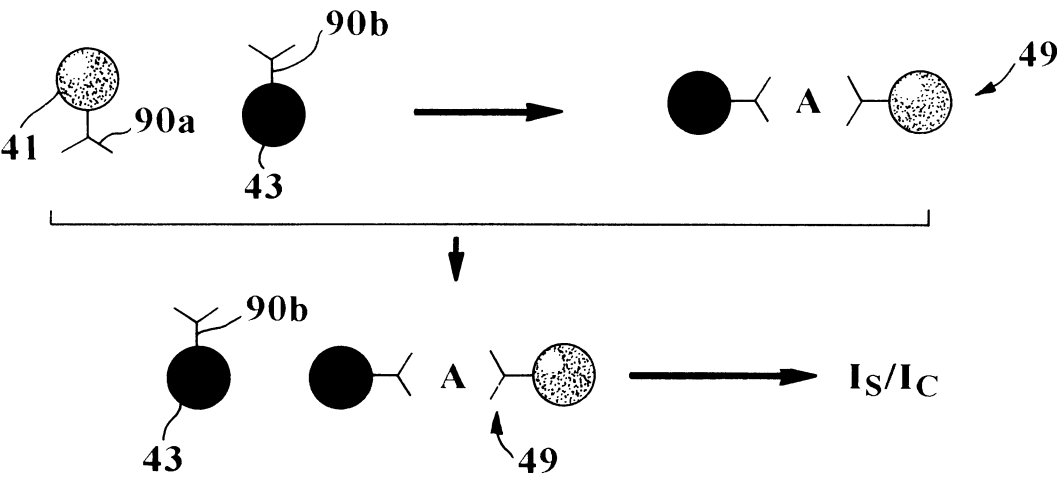
提供一種偵檢試驗樣本內之分析物存在或數量的以流體力學為基礎的化驗設備。此設備利用自行校正磁性連結化驗形式(例如夾層、競爭等等)，包括可產生偵檢信號(例如螢光非磁性顆粒)的偵檢探針以及可產生校正信號(例如螢光磁性顆粒)的校正探針。試驗樣本內的分析物數量與由校正信號強度校正的偵檢信號強度成比例(例如正比或反比)。已發現本發明的根據流體設備提供準確、便宜且可輕易控制試驗樣本中分析物存在的測定方法。

陸、英文發明摘要：FLUIDICS-BASED ASSAY DEVICES

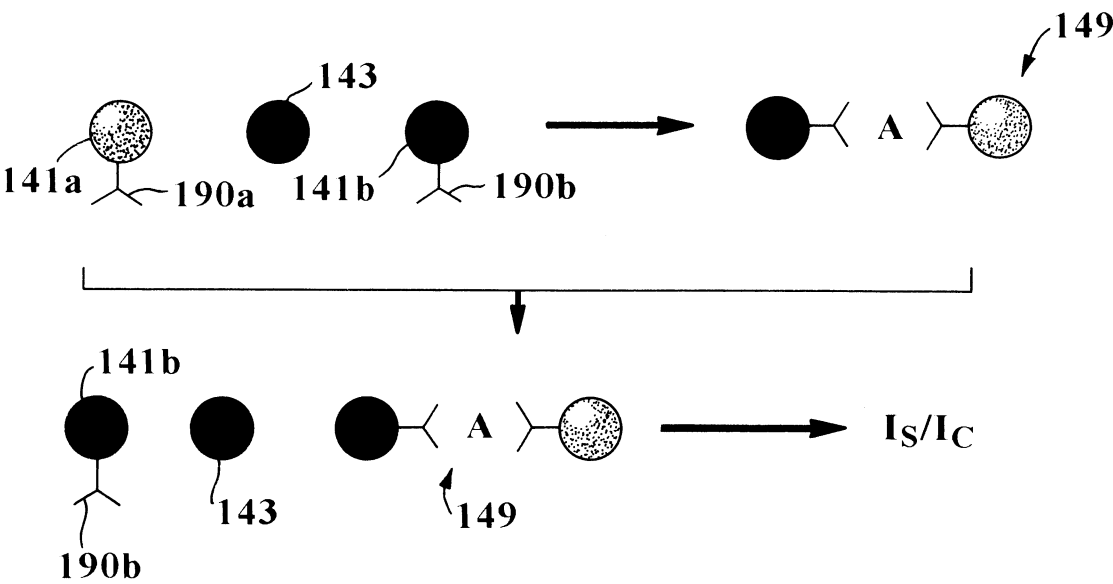
A fluidics-based assay device for detecting the presence or quantity of an analyte residing in a test sample is provided. The device utilizes a self-calibrated magnetic binding assay format (e.g., sandwich, competitive, etc.) that includes detection probes capable of generating a detection signal (e.g., fluorescent non-magnetic particles) and calibration probes capable of generating a calibration signal (e.g., fluorescent magnetic particles). The amount of the analyte within the test sample is proportional (e.g., directly or inversely) to the intensity of the detection signal calibrated by the intensity of the calibration signal. It has been discovered that the fluidics-based device of the present invention provides an accurate, inexpensive, and readily controllable method of determining the presence of an analyte in a test sample.



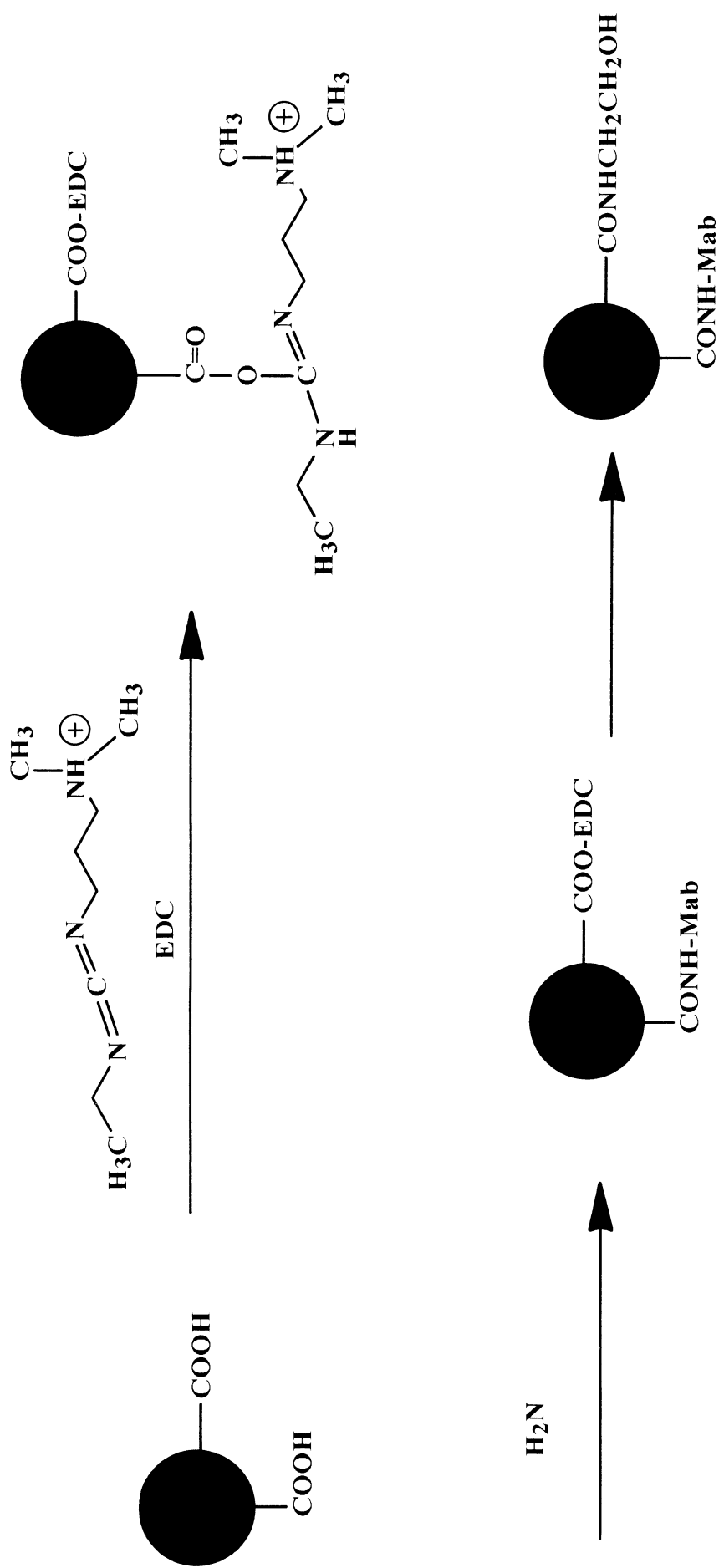
第一圖



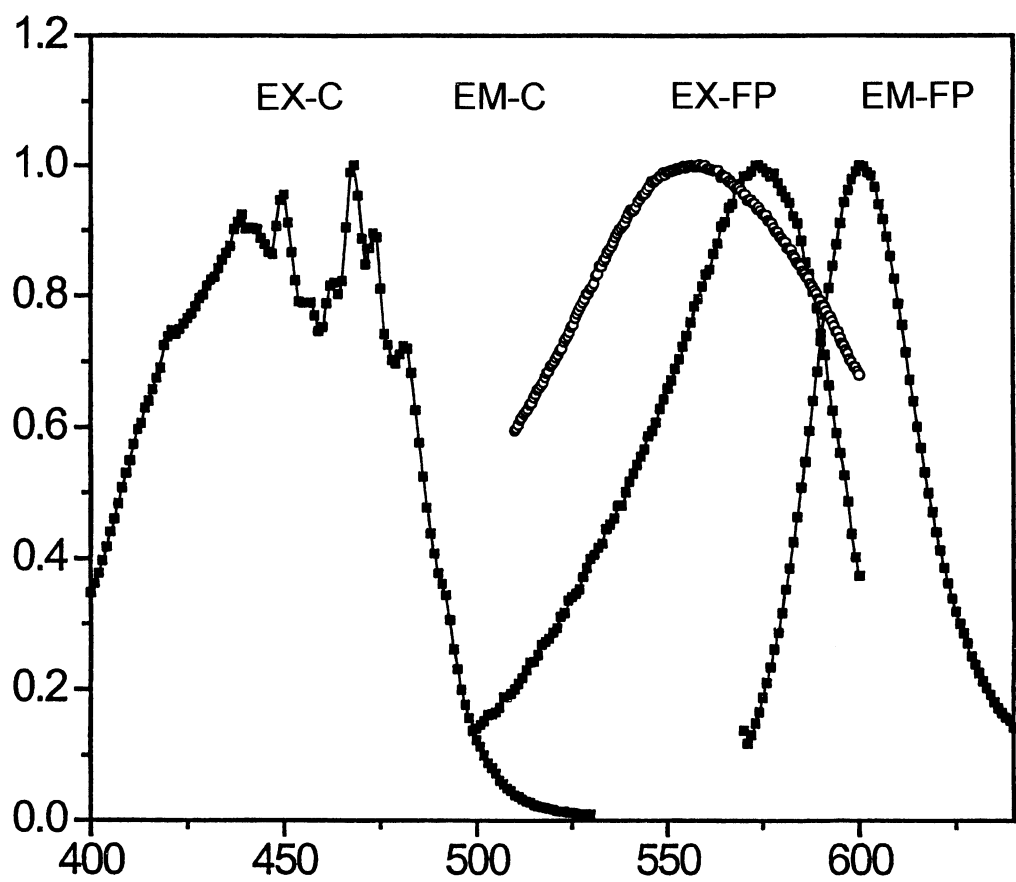
第 二 圖



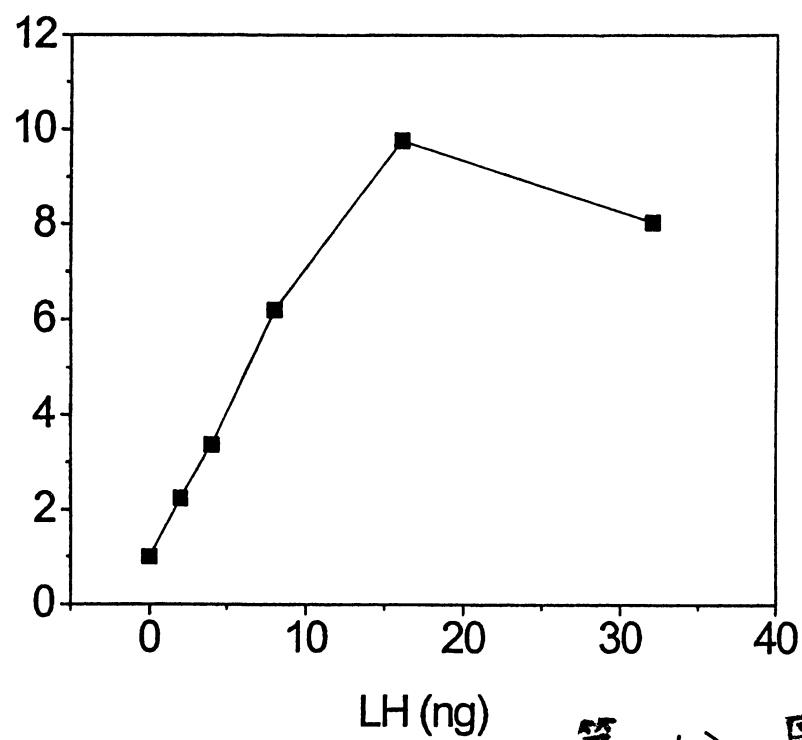
第 三 圖



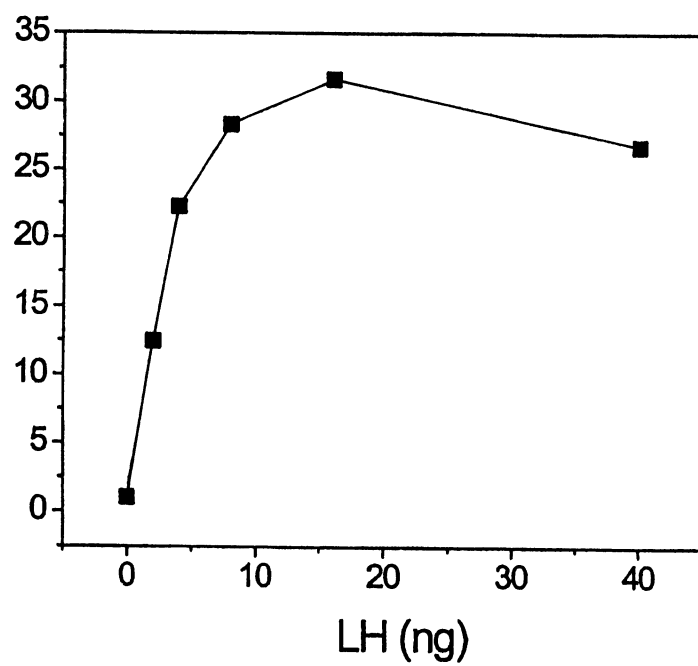
第六圖



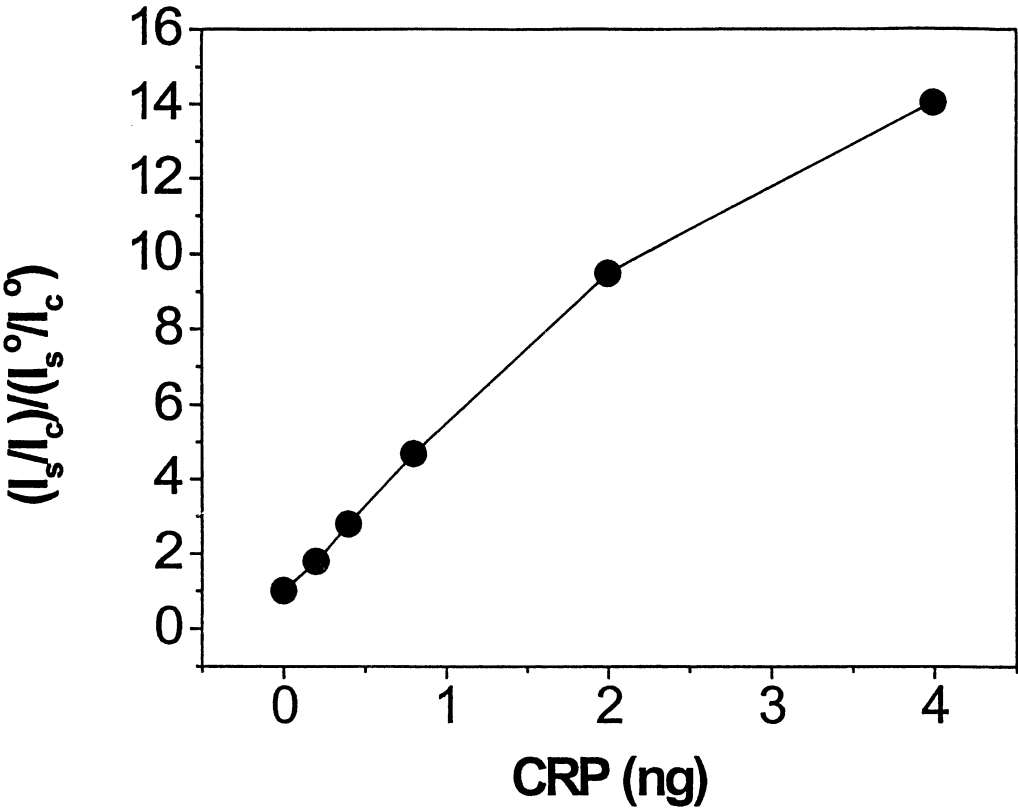
第七圖



第八圖



第九圖



第十圖

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (一) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

12	reaction chamber	反應室
14	fluidic channel	流體通道
20	fluidic-based device	以流體力學為基礎的設備
28	wicking pad	芯吸襯墊
31	detection zone	偵檢地區
41	detection probe	偵檢探針
43	calibration probe	校正探針
49	complex	合成物
60	magnetic device	磁性設備
70	barrier	隔板

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

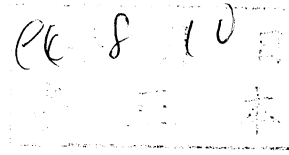
(14) 8 10

防止非特定連結至分析物，藉以允許此顆粒僅充當校正探針。

根據混合，對結合的非螢光磁性顆粒(341b)而言，分析物與結合的螢光非磁性顆粒(341a)競爭，使得形成分析物及非螢光磁性顆粒(341b)的合成物以及非螢光磁性顆粒(341b)及螢光非磁性顆粒(341a)的合成物。合成物(349a)及(349b)可自反應室(12)移往流體通道(14)中的偵檢地區(31)。在偵檢地區(31)中，然後合成物(349a)及(349b)以及任何非連結顆粒(343)與/或者(341b)以磁性設備(60)捕獲，並自剩餘樣本分離。如上所述，分析物的絕對數量可藉由比較捕獲螢光非磁性顆粒(341a)的螢光強度 I_s 及捕獲螢光磁性顆粒(343)的螢光強度 I_c 來確定。尤其，估計且明白捕獲螢光磁性顆粒(343)的總數量，且因此可使用作為校正目的。因此，在此實施例中的分析物數量與 I_s 與 I_c 的比率成反比。

雖然上面已描述設備形狀的各種不同實施例，將了解設備(20)一般可具有任合理想形狀。舉例來說，設備(20)可含有多數流體通道(14)與/或者反應室(12)。在此方式中，同時可使用單一設備(20)完成較大多數分析物的偵檢。另外，不同化驗形式也可用於設備(20)。例如，可形成競爭化驗，比如第四圖所示且描述於上，除了顆粒(241)為螢光磁性顆粒，且顆粒(243)為螢光非磁性顆粒。同樣地，可形成競爭化驗，比如第五圖所示且描述於上，除了顆粒(341a)為非螢光磁性顆粒，且顆粒(341b)為螢光非磁性顆粒。各種不同其他設備形狀與/或者化驗形式也由 Cottingham 描述於美國專利編號第 4,596,695 號;Cox 等人描述於美國專利編號第 5,145,784 號;Lambotte 等人描述於美國專利編號第 5,395,754 號;Jou 等人描述於美國專利編號第 5,670,381 號;以及 Malick 等人的美國專利編號第 6,194,220 號，其完全合併於此作為參考目的。

再者，雖然上面已明確描述關於使用螢光作為機構校正及偵檢的各種不同實施例，其他已知偵檢機構同樣適用於本發明中。舉例來說，在



拾、申請專利範圍：

1. 一種以流體力學為基礎的化驗設備，此用來偵檢存於試驗樣本中分析物的存在或數量，該設備包含：
 - 一反應室，該反應室可含有包含試驗樣本的溶液，產生一偵檢信號的偵檢探針以及可產生一校正信號的磁性校正探針；
 - 一通道，此與該反應室流體聯繫，該通道定義為一偵檢地區；以及
 - 一磁性設備，此鄰接該偵檢地區，該磁性設備可自該溶液分離該偵檢探針及校正探針；

其中試驗樣本內的分析物數量與由該分離偵檢探針在偵檢地區產生的偵檢信號強度成比例，此由分離校正探針在偵檢地區所產生的校正信號強度校正。
2. 如申請專利範圍第 1 項的設備，其中該通道促進試驗樣本的毛細管流動。
3. 如申請專利範圍第 1 項的設備，進一步包含在該反應室及該通道之間的隔板，該隔板能保持該反應室內的溶液一段時間。
4. 如申請專利範圍第 3 項的設備，其中該隔板能被該溶液充分分解。
5. 如申請專利範圍第 4 項的設備，其中該隔板含有選自由碳水化合物、鹽類及其化合物形成的材料。
6. 如申請專利範圍第 3 項的設備，其中該隔板在一段時間後會物質破裂。
7. 如申請專利範圍第 1 項的設備，其中該偵檢探針及該校正探針為螢光化合物、化合光化合物(chemiluminescent compounds)、磷光化合物或上述化合物的結合。
8. 如申請專利範圍第 1 項的設備，其中該偵檢探針為螢光非磁性化合物。
9. 如申請專利範圍第 1 項的設備，其中該校正探針為螢光磁性顆粒。
10. 如申請專利範圍第 1 項的設備，其中該偵檢探針可連結至分析物。

11. 如申請專利範圍第 1 項的設備，進一步包含非螢光磁性顆粒。
12. 如申請專利範圍第 11 項的設備，其中該非螢光磁性顆粒能連結至分析物。
13. 如申請專利範圍第 1 項的設備，其中該分離偵檢探針包括由該偵檢探針形成的合成物。
14. 如申請專利範圍第 1 項的設備，其中該分離校正探針包括由該校正探針形成的合成物。
15. 如申請專利範圍第 1 項的設備，其中試驗樣本內的分析物數量與由該分離偵檢探針在偵檢地區產生的偵檢信號強度除以由該分離校正探針在偵檢地區產生的校正信號強度成比例。
16. 一種偵檢存於試驗樣本內之分析物存在或數量的毛細管流動化驗設備，該設備包含：
 - 一反應室，該反應室可含有包含試驗樣本的溶液、可產生偵檢信號的偵檢探針，以及可產生校正信號的磁性校正探針；
 - 一隔板，此在該反應室及該毛細管通道之間，該隔板能保持該反應室內的溶液一段時間；以及
 - 一磁性設備，其鄰接該偵檢地區，該磁性設備可自該溶液分離該偵檢探針及該校正探針；其中試驗樣本內的分析物與由分離偵檢探針在偵檢地區產生的偵檢信號強度成比例，此由分離校正探針在偵檢地區產生的校正信號強度校正。
17. 如申請專利範圍第 16 項的設備，其中該隔板可用該溶液充分分解。
18. 如申請專利範圍第 17 項的設備，其中該隔板含有選自由碳水化合物、鹽類及其化合物形成的材料。
19. 如申請專利範圍第 16 項的設備，其中該隔板在一段時間後會物質破

裂。

20. 如申請專利範圍第 16 項的設備，其中該偵檢探針及該校正探針為螢光化合物。
21. 如申請專利範圍第 16 項的設備，其中該偵檢探針為螢光非磁性化合物。
22. 如申請專利範圍第 16 項的設備，其中該校正探針為螢光磁性顆粒。
23. 如申請專利範圍第 16 項的設備，其中該分離偵檢探針包括由該偵檢探針形成的合成物。
24. 如申請專利範圍第 16 項的設備，其中該分離校正探針包括由該校正探針形成的合成物。
25. 如申請專利範圍第 16 項的設備，其中試驗樣本內的分析物數量與由該分離偵檢探針在偵檢地區產生的偵檢信號強度除以由該分離校正探針在偵檢地區產生的校正信號強度成比例。
26. 一種偵檢試驗樣本內之分析物存在或數量的方法，該方法包含：
 - i. 提供以流體力學為基礎的設備，該設備包含：
 - a) 一反應室，其含有可產生偵檢信號的偵檢探針以及可產生校正信號的校正探針；
 - b) 一通道，其與限定為偵檢地區的反應室流體聯繫；以及
 - c) 一磁性設備，其鄰接該偵檢地區；
 - ii. 將含有分析物的試驗樣本運用於反應室，以形成一溶液；
 - iii. 允許該溶液自該反應室流動至該通道的偵檢地區；
 - iv. 將該偵檢探針及該校正探針使用該磁性設備自偵檢地區中的溶液分離；
 - v. 激發該分離偵檢探針及該分離校正探針，其中激發引起該分離偵檢探針發出偵檢信號，且該分離校正探針發出校正信號；

- vi. 測量在第一放射波長中的偵檢信號強度以及在第二放射波長中的校正信號強度;以及
 - vii. 比較偵檢信號強度及校正信號強度，其中試驗樣本內的分析物數量與由校正信號強度校正的偵檢信號強度成比例。
- 27. 如申請專利範圍第 26 項的方法，進一步包含將溶液以隔板保持於該反應室內一段時間，此隔板在該反應室及該通道之間。
 - 28. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中該偵檢及校正探針為螢光。
 - 29. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中該偵檢及校正探針為化合光 (chemiluminescent)。
 - 30. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中該偵檢及校正探針為磷光。
 - 31. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中該偵檢探針為非磁性。
 - 32. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中該分離偵檢探針包括由該偵檢探針形成的合成物。
 - 33. 如申請專利範圍第 29 項的方法，其中該合成物以分析物形成。
 - 34. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中該該分離校正探針包括由該校正探針形成的合成物。
 - 35. 如申請專利範圍第 31 項的方法，其中該合成物以分析物形成。
 - 36. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中該第一放射波長與第二放射波長不同。
 - 37. 如申請專利範圍第 26 項的方法，進一步包含由標出偵檢信號強度所產生的校正曲線，此由多數估計分析物濃度的校正信號強度校正。
 - 38. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中同時激發該分離偵檢探針及該分離校正探針。
 - 39. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中個別激發該分離偵檢探針及該分離校正探針。

40. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中同時測量該偵檢信號強度及校正信號強度。
41. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中個別測量偵檢信號強度及校正信號強度。