

發明專利說明書 200426369

(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：P3107368

※ 申請日期：P3.3.19

※IPC 分類：G01N 33/543, 33/53

一、發明名稱：(中文/英文)

減少分析設備中的鉤扣效果及其偵檢方法

REDUCTION OF THE HOOK EFFECT IN ASSAY DEVICES

二、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 Dm 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, Wisconsin 54956

國 籍：(中文/英文) 美國 USA

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 寧·魏 Ning Wei

2. 彥賓·黃 Yanbin Huang

3. 凱元·楊 Kaiyuan Yang

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 USA

2. 美國 USA

3. 美國 USA

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；西元 2003 年 4 月 3 日；10/406,631
- 2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序

註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

一般在流式化驗中使用各種不同分析程序及設備來測定試驗樣本中存有的分析物與/或者濃度。例如，免疫分析利用免疫系統機構，其中製造存有致病或與有機體無關的抗原之抗體。這些抗體及抗原(即免疫反應物)能互相黏結，藉以引起高特定反應機構，此可使用於測定生物樣本中存有的特殊抗原或濃度。

【先前技術】

有數個眾所周知的免疫方法，此使用標有可偵檢成分的免疫反應物，因此可分析偵檢分析物。舉例來說，“三明治型”(sandwich-type)化驗一般牽涉試驗樣本與可偵檢探針混合，比如染色乳液或放射性同位素，此與特定分析物的黏合構件結合。結合探針形成具有分析物的合成物。然後這些合成物抵達固定抗體地區，此處在抗體及分析物之間發生黏結，以形成三元的“三明治合成物”(sandwich complexes)。三明治合成物位於偵檢分析物地區。此技巧可使用於獲得定量或半定量結果。此三明治型化驗的一些範例由 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。

無論如何，當暴露於較高分析物濃度時，許多傳統的“三明治型”化驗構成遭遇相當不正確。換句話說，當分析物在高濃度時，試驗樣本中有很多部分無法形成具有結合探針的合成物。因此，根據偵檢地區，未合成的分析物為了黏合處而與合成的分析物競爭。因為未合成的分析物不標有探針，因而無法偵檢。所以，假使相當數目的黏結處變得被未合成的分析物佔領，化驗可表示“偽陰性”(false negative)。此問題一般稱為“鉤扣效果”(hook effect)。

已在免疫分析中提出減少“鉤扣效果”的各種不同技術。例如，Neumann 等人 的美國專利編號第 6,184,042 號描述在三明治化驗中減少鉤扣效果的一種技術。此技術牽涉在固相中培養樣本，此固相具有至少二個可黏結至分析物的受體。第一受體為黏結

分子的齊聚體，此選自抗體、抗體斷片及其混合物。第二受體黏結或可黏結至固相。使用可溶解的齊聚體抗體意謂減少“鈎扣效果”。

無論如何，仍需在簡單、有效率及較便宜方式中存有減少“鈎扣效果”的改善技術。

【發明內容】

依照本發明的一實施例，揭發偵檢分析物在試驗樣本中的存在或數量之方法。此方法包含：

i) 提供流式化驗設備，此包含與偵檢探針聯繫的多孔薄膜，此可產生一偵檢信號，偵檢探針與分析物的特定黏結構件結合，多孔薄膜定義為固定接收材料內的偵檢地區；

ii) 將含有分析物的試驗樣本與結合偵檢探針接觸，因此形成分析物/探針合成物及未合成分析物；

iii) 允許未合成分析物接受非特定黏結；以及

iv) 在分析物/探針合成物與偵檢地區內的接受材料之間形成三元合成物，其中接受材料剩下較自由的未合成分析物。

例如，在一實施例中，未合成的分析物未具體黏結至至少結合偵檢探針部分的範圍。在此實例中，含有此範圍的結合偵檢探針可個別定義為構成約 20%至 100%空間體積(被探針佔領)的中空內側。這些“中空”探針可具有一內側表面及一外側表面，其中內側表面包括此範圍。在一實施例中，此範圍為疏水性。

依照本發明的另一實施例，揭發流式化驗設備，以偵檢試驗樣本內分析物的存在或數量。流式化驗設備包含一多孔薄膜，此薄膜與可產生一偵檢信號的偵檢探針聯繫。當接觸時，偵檢探針與分析物的特定黏結構件結合，並構成與試驗樣本中的分析物結合，使得形成分析物/探針的合成物及未合成的分析物。結合偵檢探針進一步含有能非特定黏結至未合成分析物的範圍。多孔薄膜也定義為固定接收材料內的偵檢地區，此構成黏結至分析物/探針的合成物。結合的偵檢探針可在偵檢地區內產生一偵檢信號，因此可自該

偵檢信號測定試驗樣本內的分析物。

本發明的其他特性及觀點將更詳述探討於下。

【實施方式】

定義

此處所使用“分析物”(analyte)一詞意謂偵檢的物質。例如，分析物可包括抗原物質、半抗原、抗體及其結合物。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、麻醉劑(包括那些施行治療目的以及施行不法目的)、藥劑媒介或副產品、細菌、病毒顆粒及代謝物或任何上面物質的抗體。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);毛地黃;抗癲癇藥;苯巴比妥;卡巴氮平;萬股黴素;見大黴素;茶鹼;帝拔癲(valproic acid);異金雞納鹼;黃體化荷爾蒙(LH);促卵泡激素荷爾蒙(FSH);雌二酮、黃體脂酮;C-反應蛋白;lipocalins;IgE 抗體;維他命 B2 微球蛋白;糖化血色素(glycated hemoglobin)(Gly. Hb);腎上腺皮質醇;洋地黃毒素;N-乙普魯卡因(NAPA);proccainamide(用於治療不整脈);德國麻疹的抗體(比如德國麻疹-IgG 及德國麻疹 IgM);住血原病蟲的抗體(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 型肝炎核心抗體(比如 B 型肝炎核心抗體 IgG 及 IgM(Anti-HBC));人體免疫缺陷病毒 1 及 2(HIV 1 及 2);人體 T 細胞血癌病毒 1 及 2(HTLV);B 型肝炎 e 抗體(HBeAg);B 型肝炎 e 抗體(Anti-HBe);流行性感冒病毒;甲狀腺刺激荷爾蒙(TSH);甲狀腺素(T4);總三碘甲狀腺素(Total T3);自由三碘甲狀腺素(Free T3);癌胚抗原(CEA);以及血中胎兒蛋白(α -fetal protein)(AFP)。濫用及控制物質的藥劑包括(但不受限)安非他命;氧化血紅素;巴必妥酸鹽(比如戊巴必妥、西可巴必妥、戊基巴必妥、苯巴必妥及巴必妥);苯二氮(比如 librium 及 valium);大麻鹼(比如印度大麻葉及大麻煙);古柯鹼;吩坦尼;LSD;白板;鎮靜劑(比如海洛英、嗎啡、可待因、二氫嗎啡酮、氫可酮、美沙酮、可

待因酮、羥二氫嗎啡酮及鴉片);環煙六胺;以及 propoxyhene。其他有可能的分析物可由 Everhart 等人描述於美國專利編號第 6,436,651 號以及 Tom 等人的美國專利編號第 4,366,241 號。

此處所使用“試驗樣本”(test sample)一詞意謂涉嫌含有分析物的材料。試驗樣本可直接使用作為獲自來源或下面預先處理方式,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,此包括血液、組織液、唾液、眼睛水晶體流體、腦脊髓液(cerebral spinal fluid)、汗水、尿液、乳汁、腹水、沙啞、關節液、腹膜液、陰道流體、羊水等等。在使用前可預先處理試驗樣本,比如自血液、稀釋黏液等等準備血漿。處理方法可牽涉過濾、沉澱、稀釋、蒸餾、混合、濃縮、減除妨害成分的活性及加入試劑。除了生理流體外,可使用其他液體樣本,比如水、食品生成物等等,以執行環境或食品製作化驗。另外,涉嫌含有分析物的固體材料可使用作為試驗樣本。在一些實例中,此有益於變更固體試驗樣本,已形成液體媒介物或將分析物分離。

詳述

目前的參考文獻將詳述此發明的各種不同實施例,下面發表一或更多範例。每個範例經由此發明說明提供,對此發明無限制。事實上,顯然精通技藝對本發明的各種不同變更及變動無須違反此發明的範圍或精神。例如,說明或描述部分實施例的特性可使用於另一實施例,以產生更進一步實施例。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,本發明為針對以薄膜為基礎的化驗設備,以偵檢試驗樣本中的分析物存在或數量。此設備對感興趣的分析物利用含有特定黏結構件的結合探針。當接觸時,特定黏結構件優先與試驗樣本內的分析物合成。剩下未與特定黏結構件合成的過多分析物允許接受非特定黏結,比如範圍(例如表面、分子等等)。結果,限制未合成分析物與合成分析物在設備的偵檢地區競爭。因此,“偽陰性”(false negatives)的發生率限於簡單、有效率及較便宜的方式

中。

引用第一圖列如，流式化驗設備(20)的一實施例可根據本發明形成，此將詳述於下。如圖示，設備(20)含有一多孔薄膜(23)，此可任意由硬性材料(21)支撐。一般而言，多孔薄膜(23)可由任何各種不同材料經由可通過的試驗樣本製造。舉例來說，使用於形成多孔薄膜(23)的材料可包括(但不受限)天然、合成或天然發生而合成變更的材料，比如多醣類(例如纖維素材料(比如紙張)及纖維素衍生物(例如纖維素醋酸人造絲及硝化纖維素));聚醚磺胺;尼龍薄膜;矽石;無機材料(比如無作用的礬土、矽藻土、 $MgSO_4$ 或其他無機細分材料，此一律分散於多孔聚合基質，具有聚合物，比如氯化烯、氯化烯-丙烯共聚物及氯化烯-醋酸乙烯共聚物);布料、天然發生(例如棉布)及合成(例如尼龍及人造絲);多孔凝膠(比如矽凝膠、洋菜、右旋醣及骨膠);聚合薄膜(比如聚丙烯醯胺)等等。在一特別實施例中，多孔薄膜(23)由硝化纖維素與/或者聚醚磺胺材料形成。需了解此項“硝化纖維素”(nitrocellulose)引用纖維素的硝酸酯，此可為單一硝化纖維素或硝酸及其他酸的混合酯，比如具有1置7個碳原子的脂肪族羧酸。

此設備(20)也可含有一芯吸襯墊(28)。芯吸襯墊(28)一般接收移經全部多孔薄膜(23)的流體。如眾所周知的技藝，芯吸襯墊(28)可幫助促進毛細管作用，且流體流經薄膜(23)。

欲發起偵檢試驗樣本內的分析物，使用者可經由移動而直接將試驗樣本運用於多孔薄膜(23)部分。或者，試驗樣本首先可運用於抽取襯墊(無圖示)，此與多孔薄膜(23)流體聯繫。可使用於形成抽取襯墊的一些適當材料包括(但不受限)硝化纖維素、纖維素、多孔聚乙烯襯墊及玻璃纖維濾紙。假使理想的話，抽取襯墊也可含有一或更多化驗預先處理試劑，此不是擴散性就是非擴散性附著。

在此說明的實施例中，試驗樣本自抽取襯墊(無圖示)移至結合襯墊(22)，此與抽取襯墊的一末端聯繫。結合襯墊(22)由可通過試驗樣本的材料形成。舉例來說，在一實施例中，結合襯墊(22)

由玻璃纖維形成。雖然僅顯示一結合襯墊(22)，需了解本發明也可使用其他結合襯墊。

欲促進正確偵檢試驗樣本內分析物的存在與否，在設備(20)的各種不同位置運用探針，此目的為偵檢與/或者校準。如更詳述於下，探針一般含有標有產生信號物質的顆粒或小珠。例如，各種不同適當標籤包括(但不受限)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(此包括膠質金屬(例如金)及非金屬顆粒、染料顆粒、酵素或酶作用物或有機聚合乳膠顆粒);超微脂囊或其他含有產生信號物質的水泡等等。例如，適合使用作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，其為所有目的而完全合併於此作為參考。酵素/酶作用物系統的一範例為酵素鹼性的活性磷酸酯酶及酶作用物硝酸藍 4-zolium-5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸鹽或衍生物或其相似物，或酶作用物 4-甲基織形磷酸鹽。其他適當標籤可由 Jou 等人 描述於美國專利編號第 5,670,381 號以及 Tarcha 等人 的美國專利編號第 5,252,459 號，其為所有目的而完全合併於此作為參考。

在一些實施例中，標籤可含有螢光化合物，此產生一可偵檢信號。螢光化合物可為螢光分子、聚合物、樹狀聚合物、顆粒等等。例如，適當螢光分子的一些範例包括(但不受限)螢光素、螯化鎘、藻膽蛋白、玫瑰紅顏料及其衍生物與相似物。視覺偵檢的有色化合物也可使用作為標籤，藉以提供直接有色讀出分析物在樣本中是否存在或濃度，此不需進一步產生信號試劑。

通常，探針顆粒以分析物的特定黏結構件變更，以形成結合探針。特定黏結構件引用特定黏結組的構件，即二個不同分子，此處其中一分子乃化學與/或者物理黏結至第二分子。例如，免疫反應特定黏結構件可包括抗原、半抗原、適合體、抗體及其合成物，此包括由重組 DNA 方法或縮氨酸合形成。抗體可為單株抗體或多株抗體、重組蛋白或混合物或其斷片，以及為抗體及其他特定黏結構件的混合物。此抗體及其適合使用作為特定黏結構件的詳述製

備為眾所周知的精通技藝。其他共同特定黏結組包括(但不限定)維生素 H 及抗生物性蛋白、碳水化合物及血球凝集物質(lectin)、補充核甘酸順序(包括探針捕獲核酸，此使用於 DNA 雜變化驗，以偵檢目標核酸順序)、補充縮氨酸順序(包括由重組方法、作用器及受體分子形成)、荷爾蒙及荷爾蒙黏結蛋白、酵素輔助因子及酵素、酵素抗化劑及酵素等等。再者，特定黏結組可包括最初特定黏結構件相似物的構件。舉例來說，可使用分析物的衍生物或斷片(即相似分析物)，只要與分析物一樣具有至少一抗原決定基。

特定黏結構件可使用各種任何已知技術而附著至顆粒。例如，特定黏結構件至顆粒的共價連結可使用羧基、氨基、乙醛、溴化乙醯基、碘化乙醯基、硫醇、環氧基及其他反應或連接官能基以及剩餘自由基及基本陽離子完成，可經由蛋白偶合反應完成。表面官能基也可隨官能化共同單體而合併，因為顆粒表面可含有較高表面濃度的極性部分。另外，雖然顆粒常常在合成後官能化，在某情形中，比如聚硫酚，顆粒可直接與蛋白共價連結，此無需進一步變更。舉例來說，引用第二圖，說明本發明共價結合一顆粒的一實施例。如所示，結合的第一步驟為使用碳化二亞胺使羧基在顆粒表面的活化。在第二步驟中，將活化的羧酸基與抗體的氨基反應，已形成一醯胺鍵。活化與/或者抗體偶合可發生於緩衝物中，比如磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)(例如 pH 7.2)或嗎林乙基磺酸(MES)(例如 pH 5.3)。如圖示，然後結果中空顆粒可用乙醇胺封閉，例如封閉任何剩餘活化處。整體而言，此作用形成結合，此處抗體共價附著至顆粒。除了共價連結外，本發明也可利用其他附著技術(比如物質吸附)。

再度引用第一圖，化驗設備(20)也可含有一偵檢地區(31)，此固定可黏結至結合探針的接收材料。舉例來說，在一些實施例中，接收材料可為生物接收材料。此生物接收材料為熟知的技藝，並可包括(但不受限)抗原、半抗原、抗體、蛋白質 A 或 G、抗生物性蛋白、第二抗體及其合成物。在一些情形中，理想的是這些

生物接收材料可黏結至探針上的特定黏結構件(例如抗體)。另外，同樣理想為利用接收材料的各種不同非生物材料。例如，在一些實施例中，接收材料可包括聚合電解質。聚合電解質可具有淨正或負電荷，而且靜電荷一般為中性。例如，具有淨正電荷之聚合電解質的一些適當範例包括(但不受限)聚離氨酸(商業上獲自密蘇里州路易斯街的 Sigma-Aldrich 化學公司)、聚乙撐亞胺; α -環氧-氯-丙烷-官能聚胺與/或者 polyamidoamines(比如聚(二甲胺-共同- α -環氧-氯-丙烷)); 二烯丙基二甲基氯化銨;陽離子纖維素衍生物(比如與四級銨鹽水溶性單體接枝的纖維素共聚物或纖維素衍生物)等等。在一特別實施例中，可利用 CelQuat® SC-230M 或 H-100(獲自 National Starch & 化學公司)，此為含有四級銨鹽水溶性單體的纖維素衍生物。再者，具有淨負電荷之聚合電解質的一些適當範例包括(但不受限)聚丙烯酸(比如聚乙烯共甲基丙烯酸、鈉鹽)等等。也須了解也可利用其他聚合電解質，比如兩性聚合電解質(即具有極性及非極性部分)。例如，適當兩性聚合電解質的一些範例包括(但不受限)聚(苯乙烯基-b-N-甲基 2-乙基吡啶鹽碘化物)及聚(苯乙烯基-b-丙烯酸)，二者獲自加拿大 Dorval 的 Polymer Source, Inc.。

接收材料作為分析物/探針合成物的固定連結處。換句話說，分析物(比如抗體、抗原等等)一般具有二個黏結處。根據抵達偵檢地區(31)，其中一黏結處被結合探針的特定黏結構件佔領。無論如何，分析物的自由黏結處可黏結至固定的接收材料。根據黏結至固定的接收材料，合成探針形成新的三元三明治合成物。

偵檢地區(31)一般可提供許多獨特偵檢區域，因此使用者可較佳測定試驗樣本內的特定分析物濃度。每個區域可含有箱柙接收材料或可含有不同接收材料，以捕獲多數分析物。舉例來說，偵檢地區(31)可包括二或更多獨特偵檢區域(例如線、點等等)。偵檢區域可在大致與試驗樣本流經化驗設備(20)垂直的方向中以線形配置。同樣地，在一些實施例中，偵檢區域可在大致與試驗樣本流經化驗設備平行的方向中以線形配置。

雖然偵檢地區(31)可指示分析物的存在，單獨使用偵檢地區(31)常常困於測定試驗樣本內分析物的相對濃度。因此，化驗設備(20)也可包括一校準地區(32)。在此實施例中，在多孔薄膜(23)上形成校準地區(32)，並配置於校準地區(31)的下游。校準地區(32)提供可黏結至任何剩餘未捕獲的探針，此探針通過薄膜(23)的長度。校準地區(32)中所利用的接收材料可與使用於偵檢地區(31)使用的接收材料相同或相異。再者，與偵檢地區(31)類似的是，校準地區(32)也可在任何方向提供許多個別校準區域，因此使用者可較佳測定試驗樣本內的特別分析物濃度。每個區域可含有相同接收材料，或可含有不同接收材料，以捕獲不同探針。

校準區域可預先以不同數量的接收材料裝填於多孔薄膜(23)上，因此由每個校準區域根據探針遷移而產生不同信號強度。可利用不同尺寸的校準區域與/或者改變每個校準區域中接收材料的濃度或體積而改變每個校準區域內的所有黏結劑數量。假使理想的話，過多探針可運用於化驗設備(20)中，因此每個校準區域達到信號強度本身充滿及預定可能性。即，因為預定及設定已知程度在校準區域上運用的接收材料數量，則可預定校準區域的探針數量。

不分化驗設備的正確結構，結合探針含有感興趣分析物的特定黏結構件。結果，當接觸時，結合探針能夠與分析物合成。不巧，試驗樣本中的分析物數量有時超過由特定黏結構件提供的合成處數目。傳統上，為了位於偵檢地區(31)的接收材料，此未合成的分析物與合成的分析物競爭。欲抵制此“鉤扣效果”(hook affect)，本發明利用優先及非特定黏結。換句話說，由於彼此為高吸引力，探針的特定黏結構件優先黏結至分析物。當特定黏結構件變得完全佔領時，然後試驗樣本中的未合成分析物無經歷額外黏結。

因此，依照本發明，未合成分析物經歷“非特定”黏結。“非特定”黏結一般引用分析物的分子間引力至一分子或無特定分析物黏結構件的表面。可在各種方式中完成非特定黏結。舉例來說，在一實施例中，非特定黏結透過二個疏水性範圍(例如表面、

分子等等)之間的引力發生。即，雖然分析物中含有的試驗樣本為水性，分析物本身含有疏水性範圍。因此，未合成分析物的疏水性範圍並非特定藉疏水性引力而黏結至另一疏水性範圍。疏水性交互作用通常描述非極性/分子/表面之間在水性環境中的引力。相信疏水性引力最初經由自由能自疏水性表面獲得相關水分子分離而發生，即與蓬鬆相中的水分子比較下，接觸疏水性表面的水分子在自由能項目中為較不有利狀態。疏水性交互作用的更多詳述探討可由 Israelachvil 及 Wennerstrom, Nature, 1996 年, 379, 219-225; Israelachvili, Intermolecular & Source Forces(第二版), Academic Press, 1991 年;以及 van Oss, Interfacial Forces in Aqueous Media, Marcel Dekker, 1994 年。除了疏水性交互作用外，也發生其他非特定黏結。舉例來說，可發生靜電引力(比如氫鍵結或離子鍵結)，以減少鉤扣效果。

欲避免減少化驗設備的正確性，一般理想為運用非特定黏結技術可辨別合成及未合成分析物。在大部分實施例中，此差別由尺寸區別完成。舉例來說，結合探針可含有足夠大的氣孔，以允許較小的未合成分析物通過，但小到足以阻塞較大的合成分析物。舉例來說，氣孔可具有約小於 100 nm(十億分之一公尺)的平均尺寸，在一些實施例中約為 5 至 100 nm，且在一些實施例中約為 0.1 至 60 nm。藉含有某尺寸的氣孔，結合探針可辨別合成及未合成的分析物，此僅允許未合成分析物通過。

再者，在一些實施例中，結合探針也可為“中空”，即個別定義中空內側，此由約 20%至 100%構成，且在一些實施例中，約 30%至 100%的空間體積被探針佔領。即，每個中空探針的相當空間部分剩餘為空的。中空內側可提供許多好處。例如，在一些實施例中，顆粒的內側表面可較疏水性。結果，當未合成分析物移經氣孔時，此可藉疏水性交互作用而非特定黏結至疏水性的內側表面。在一實施例中，中空探針為乳膠的中空小珠，此由聚丙烯酸及殼式聚合物及聚苯乙烯芯式聚合物。聚苯乙烯芯式聚合物形成可非

特定黏結至未合成分析物的疏水性內側表面。雖然此引力不如同分析物及特定黏結構件之間形成的鍵般強烈，儘管如此，相信引力強到足以阻止未合成分析物稍後與合成分析物在偵檢地區競爭。無論如何，假使理想的話，也須了解內側表面也可為親水性。

另外，未合成分析物有時可誘入中空探針的內側表面。在此實例中，未合成分析物無法與偵檢地區中連結處的合成分析物競爭，此不分是否有非特定連結。舉例來說，在一實施例中，中空探針可含有一親水性內側表面及一疏水性或外側表面。雖然一些未合成分析物將非特定連結至外側表面，此可變得誘入內側親水性表面內。進一步，進入探針中空區域的未合成分析物可簡單緩慢下降，因此在合成分析物連結至接收材料後，僅到達偵檢地區(31)。

當利用時，一般可改變中空探針的形狀。例如，在一特別實施例中，中空探針為球形。無論如何，需了解本發明也可考慮其他形狀，比如盤子、棒子、圓盤、竿狀、管狀、不規則形狀等等。另外，也可改變中空探針的尺寸。例如，中空顆粒的平均尺寸(例如直徑)範圍違約為 0.1 nm 至 1,000 微米，在一些實施例中約為 0.1 nm 至 100 微米，且在一些實施例中約為 1 nm 至 10 微米。例如，“微米刻度”顆粒常為理想的。當利用時，此“微米刻度”顆粒的平均尺寸約為 1 微米至 1,000 微米，在一些實施例約為 1 微米至 100 微米，且在一些實施例中約為 1 微米至 10 微米。同樣地，“毫微刻度”顆粒的平均尺寸約為 0.1 至 10 毫微米，在一些實施例中約為 0.1 至 5 毫微米，且在一些實施例中約為 1 至 5 毫微米。

如上所述，雖然可改變顆粒的形狀及尺寸，常常理想的是顆粒為“單徑瀰散”(monodispersed)，此為膠狀分散內的顆粒具有大約相同尺寸與/或者形狀。由於一般一定特性，單徑瀰散的中空探針可提供改善可靠性及再生性。

除了尺寸及形狀外，也可改變形成中空探針的材料。例如，中空探針事實上可為有機與/或者無機，並可為聚合物、寡聚合物、分子等等。舉例來說，中空探針可由聚合物形成，比如聚苯乙

烯、甲基丙烯酸酯聚合物或共聚物、乙稀又二氯/丙烯腈共聚物等等。其他適當的中空聚合顆粒可由 Kowalski 等人描述於美國專利編號第 4,427,836 號;Craig 等人的美國專利編號第 4,480,042 號;McDonald 等人的美國專利編號第 4,973,670 號;Choi 等人的美國專利編號第 5,618,888 號;以及 Blankenship 等人的美國專利編號第 6,139,961 號,其為所有目的而完全合併於此作為參考。其他更多使用的中空顆粒包括無機材料,比如玻璃中空顆粒。例如,ECCOSPHERES®為衍生於硼硅酸鈉的中空玻璃顆粒,此商業上獲自 Emerson 及 Curming 合成材料有限公司。例如,衍生於無機材料的其他代表性顆粒包括矽石中空微粒體,此獲自 Miyoshi Kasei, Inc. 的商標名“SILICA BEADS S700”下。中空無機顆粒的其他範例由 Radin 等人描述於美國專利編號第 6,416,774 號,其為所有目的而完全合併於此作為參考。

在一特別實施例中,中空顆粒可由一或更多天然會合成的乳膠聚合物形成。此乳膠中空顆粒的範例由 Jones 等人描述於美國專利編號第 5,663,213 號,其為所有目的而完全合併於此作為參考,且商業上獲自賓夕凡尼亞州費城的 Rohm & Haas, 此在名稱 SunSpheres®下。`213 專利描述此乳膠中空顆粒(此一般為“微米刻度”尺寸)可使用於日光防禦。無論如何,本發明家也發現乳膠中空顆粒在化驗設備中具有出乎意料的效用。

乳膠中空顆粒一般含有一芯式聚合物及一殼式聚合物。一般可改變使用於形成芯式及殼式聚合物的單體。例如,可選擇殼式聚合物來提供一玻璃轉移溫度(Tg),此高度足以支撐顆粒的空隙,例如比方約大於 50°C,在一些實施例中約大於 60°C,且在一些實施例中約大於 70°C。使用於形成殼式聚合物的適當單體之一些範例包括(但不受限)非離子烯未飽和單體、含有至少一羧酸基的單一烯未飽和單體等等。

形成芯式聚合物的單體可包括一或更多單一烯未飽和單體,此含有至少一羧酸基。在一些實施例中,例如,至少約 5 wt%

的芯式聚合物之單一烯未飽和單體含有至少一羧酸，此根據芯的總單體重量而定。含有至少一羧酸基的適當單一烯未飽和單體之範例包括(但不受限)甲基丙烯酸、丙烯氧丙酸、甲基丙烯氧丙酸、衣康酸、丙烯三羧酸、馬來酸或脫水化合物、反丁烯二酸、丁烯醛、單甲基順丁烯二酸鹽、單甲基反丁烯二酸酯、單甲基衣康酸等等。此處所使用“甲基丙烯基”((meth)acrylic)一詞意謂作為一般表示含有丙烯基及甲基丙烯基。

在一實施例中，含有至少一羧酸基的單一烯未飽和單體與一或更多非離子(例如無離子基)烯未飽和單體異分子聚合。一些適當非離子烯未飽和單體包括(但不受限)苯乙烯、乙烯基甲苯、乙烯、醋酸乙烯、氯化烯、乙稀又二氯、丙烯腈、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸的(C₁-C₂₀)烷基或(C₃-C₂₀)鏈烯酯(比如甲基(甲基)丙烯酸酯、乙基(甲基)丙烯酸酯、丁基(甲基)丙烯酸酯、2-乙基己基(甲基)丙烯酸酯、苯基(甲基)丙烯酸酯、十二基(甲基)丙烯酸酯、十八基(甲基)丙烯酸酯、十六基(甲基)丙烯酸酯、十八醯(甲基)丙烯酸酯)等等。

芯式聚合物與/或者殼式聚合物可任意含有約 0.1 wt%至 20 wt%，且在一些實施例中約為 0.1 wt%至 3 wt%的聚烯未飽和單體，此根據聚合物的總單體重量而定。此未飽和單體的範例包括(但不受限)乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、烯丙基(甲基)丙烯酸酯、1,3-丁二醇二(甲基)丙烯酸酯、乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、二乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、三羥甲基丙烷三(甲基)丙烯酸酯或二乙烯苯。假使理想的話，芯式聚合物與/或者殼式聚合物可含有約 0.1 wt%至 60 wt%的丁二烯，此根據聚合物的總單體重量而定。

欲製造乳膠顆粒中的空間，芯一般充滿膨脹劑，此含有一或更多揮發性成分。膨脹劑滲入殼，以使芯膨脹。然後膨脹劑的揮發性成分藉由乳膠顆粒除去，藉以引起在乳膠顆粒內形成空間。雖然並不需要，膨脹劑可為水性。適當水性範例包括(但不受限)氨水、氫氧化銨、鹼性金屬氫氧化物(比如氫氧化鈉)或揮發性胺(比如三甲胺或三乙胺)。也可用其他方式完成除去樣板芯，比如在高溫中燒

成灰，或藉化學反應引起芯式材料分解。

除了芯-殼中空顆粒外，也可使用其他熟知技藝形成中空顆粒。舉例來說，Caruso 等人的美國專利編號第 6,479,146 號描述使用靜電力形成中空顆粒，其為所有目的而完全合併於此作為參考。尤其，使用奈米粒子聚合物多層的模板式靜電一層一層 (“LBL”) 沉積形成中空顆粒。例如，模板顆粒可含有有機聚合物乳膠，比如聚苯乙烯或苯乙烯共聚物乳膠。

模板顆粒交替塗佈聚合電解質分子及奈米粒子。聚合電解質通常為具有離子式分離基的聚合物，此離子式分離基可為聚合鏈的成分或取代基。奈米粒子一般為陶瓷顆粒，比如任意塗有其他金屬氧化物的二氧化矽、二氧化鈦及二氧化鋯；磁性顆粒，比如 Fe_3O_4 ；磁光顆粒；氮化顆粒，比如 Si_3N_4 、碳化陶瓷顆粒；金屬顆粒，比如金、銀及鈮；以及硫磺或含 selen 顆粒，比如硫化鎘、硒化鎘等等。

在一實施例中，在使用奈米粒子及聚合電解質的交替層或交替奈米粒子層之前，模板顆粒首先塗佈數層反電荷陽離子及陰離子聚合電解質。一般模板顆粒塗佈至少二或高至六層的反電荷陽離子及陰離子聚合電解質，例如三層。最外層的聚合電解質層一般為關於放置奈米粒子的反電荷。在大部分實施例中，在已完成塗層後，模板顆粒至少部分分解。它們可溶解於適當溶劑與/或者熱溶解(例如以至少約 500°C 的溫度鍛燒)。在模板顆粒溶解後，中空殼剩下由奈米粒子及任意聚合電解質材料組成。

假使理想的話，形成靜電顆粒可改造成在至少一層含有氣孔。此氣孔可由聚合電解質或奈米粒子本身形成。例如，使用於聚合電解質沉澱的媒介物之高鹽濃度結果為高滲透性的殼壁。換句話說，使用於奈米粒子(例如 SiO_2)沉積結果為低滲透性的奈米粒子。因此，藉調整沉積媒介物中的鹽濃度，理想下可控制殼的滲透性。進一步，殼的滲透特性可由分解芯的狀況變更，例如在鍛燒程序中藉選擇溫度及加熱狀況。

一般而言，各種流式化驗設備根據本發明構成。在此顧慮

中，目前將更詳述本發明的各種不同實施例。無論如何，需了解下面探討僅為示範，且本發明考慮其他實施例。例如，引用第三圖，一特殊實施例顯示含有中空顆粒的偵檢探針(41)。在此實施例中，偵檢探針(41)運用於結合襯墊(22)，且因此在與試驗樣本聯繫時能流經設備(20)(如以方向箭號 L 表示)。偵檢探針(41)與分析物 A 的特定連結構件(90)結合，因此根據與分析物 A 接觸，探針(41)優先合成，隨即形成分析物/探針合成物(49)。之後，任何剩下的分析物進入探針(41)的內側(無圖示)，此處非明確連結至探針的內側表面，或相反變得堵住。

然後探針/分析合成物(49)自結合襯墊(22)流經多孔薄膜(23)，直到抵達偵檢地區(31)，此處連結至接收材料(91)，比如抗體，以形成三明治合成物(53)。因為未合成的分析物堵住探針(41)的內側內，此無法與接收材料的合成分析物競爭。因此，在偵檢地區(31)中，可從偵檢探針(41)的信號強度探查分析物的數量。假使理想的話，此設備(20)也可使用校準探針(43)，此流至校準地區(32)，並連結至接收材料(無圖示)，比如聚合電解質。在此實例中，在偵檢地區(31)中的信號強度可由校準地區(32)中的校準探針(43)之信號強度校準。信號強度可目視測量或經由設備(比如螢光閱讀器)幫助測量。

雖然上面已描述設備形狀的各種不同實施例，需了解本發明的設備一般可具有任何理想形狀，並不需含有上面所述的所有成分。例如，各種不同其他設備形狀與/或者化驗方式由 Lambotte 等人 描述於美國專利編號第 5,395,754 號; Jou 等人 的美國專利編號第 5,670,381 號; 以及 Malick 等人 的美國專利編號第 6,194,220 號，其為所有目的而完全合併於此作為參考。

本發明參照下面範例而可更加了解。

範例 1

提供 SunSphere™ 中空顆粒(獲自 Rohm & Haas)。這些顆

粒具有大約 25% 的固體含量，以及 300 nm(十億分之一公尺)的平均測量尺寸(根據 SEM 及顆粒分粒器而定)。以嗎林乙基磺酸緩衝物(MES, pH 5.3)清洗 500 微升的顆粒溶液二次，每次 1 公撮。變成 1 供錯的顆粒/MES 緩衝溶液，加入 30 毫克的碳化二亞胺(Polysciences, Inc.)。此反應允許 10 分鐘循環發生。

然後自反應溶液分離出空顆粒，並以 1 公撮的硼酸緩衝物清洗。將 1 毫克的螢光染料(即 5-(及-6)-(N-(5-氨基戊基)氨基)羰基)4-甲基玫瑰紅顏料-(4-甲基玫瑰紅染料屍胺)加入硼酸緩衝溶液。在一定旋轉下允許此反應發生 1 小時。在完成反應後，將表層物丟掉，且以硼酸鹽緩衝物清洗中空顆粒，直到表層物變澄清，以除去任何游離的螢光染料。然後中空顆粒再次懸浮於 1 公撮的硼酸緩衝物中，作為庫存。從庫存溶液中取出 100 微升，並稀釋於 500 微升的硼酸緩衝物中。變成此中空顆粒溶液後，加入 100 微升的單株抗體 Mab 5811(BiosPacific, 6.4 毫克/公撮)，且在一定旋轉下允許此反應發生超過 56 小時。此反應以 200 微升的乙醇胺抑制，且中空顆粒以 PBS 緩衝物清洗，且最後儲存於 500 公撮的保管緩衝物中，此緩衝物含有 0.1 克分子的 PBS、0.15 克分子的 NaCl、1% 的 BSA、5% 的甘油及 0.1% 的 NaN_3 。

範例 2

說明依照本發明形成側流化驗的能力。最初，Millipore HF120 硝化纖維素薄膜疊層具有長度大約為 30 公分的一致托卡(supporting card)。Aqueous Celquat® 100-H(獲自 National Starch & Chemical, Inc.的纖維素聚合電解質衍生物)溶液剝成薄膜，以形成一控制線。C-反應蛋白的單株抗體 Mab 5804(1 毫克/公撮，此獲自 BiosPacific, Inc.)固定於多孔薄膜樣本上，以形成一偵檢線。然後在 37°C 溫度中將薄膜樣本乾燥 1 小時。纖維素纖維芯吸視墊(Millipore 公司)附著至薄膜的其中一端，並切成 4 毫米的二分之一帶子。

將二分之一的桿帶放置各種不同微孔，此處結合範例 1 的

20 微升螢光中空探針與 20 微升的 CRP 抗原溶液或 20 微升的 TBS 緩衝物混合。含有緩衝物的微孔作為負面控制，同時含有 CRP 抗原的微孔作為正面樣本。當完成化驗時，取出二分之一桿棒，然後使用具有直角放置的 Fluorolog III 光譜螢光計(SPEX Industries, Inc., 新澤西州的 Edison)測量偵檢線上的螢光強度。偵檢線上的螢光強度直接與抗原三明治合成物的數量有關，因此直接與 CRP 抗原的濃度有關。

結果如下面表 1 所示，此處“I”表示螢光中空探針的信號強度。負面控制的信號強度考慮參考資料，並從含有 CRP 分析物的樣本信號強度扣除。須注意，即使在 5000 ng/公撮的分析物濃度，觀察無鉤扣效果。

表 1：信號強度結果

分析物(ng/公撮)	信號強度 “I”
0(控制)	44
5	115
50	160
500	240
2500	320
5000	454

範例 3

為了比較目的，此依照本發明不利用非特定連結來形成化驗設備。最初，以嗎林乙基磺酸緩衝物(MES, pH 5.3)清洗 125 微升的藍色乳膠顆粒(獲自 Bangs Laboratory, Inc., 10%的 0.3 微米尺寸)二次而形成結合乳膠珠，每次 1 公撮。乳膠顆粒再次懸浮於 500 微升的 MES 緩衝物。50 毫克的碳化二亞胺溶解於 50 微升的 MES 緩衝物中，並與 500 微升的乳膠顆粒溶液混合。允許發生活化反應 30

分鐘。顆粒自反應溶液分離後，以硼酸緩衝物清洗二次。這些顆粒再次懸浮於 1 公撮的硼酸緩衝物中，並加入 15 微升的單株 CRP 抗體 Mab 5811，且發生反應 2 又 1/2 小時。以 1 公撮的乙醇胺抑制乳膠顆粒 30 分鐘，並進一步以 PBS 緩衝物清洗二次，且最後儲存於 1 公撮的儲存緩衝物中。

欲形成化驗設備，Millipore HF 120 硝化纖維素薄膜疊成具有長度大約微 30 公分的一致托卡。Aqueous CelQuat® 100-H(獲自 National Starch & Chemical, Inc.的纖維素聚合電解質衍生物)溶液剝成薄膜，以形成一控制線。C-反應蛋白的單株抗體 Mab 5804(1 毫克/公撮，此獲自 BiosPacific, Inc.)固定於多孔薄膜樣本上，以形成一偵檢線。然後在 37°C 溫度中將薄膜樣本乾燥 1 小時。纖維素纖維芯吸視墊(Millipore 公司)附著至薄膜的其中一端，並切成 4 毫米的二分之一帶子。將二分之一的桿帶放置各種不同微孔，此處為 19 微升的 2% Tween 20 溶液與 1 微升的結合乳膠珠混合，且一起具有 20 微升的 CRP 抗原溶液或 20 微升的 TBS 緩衝物。含有緩衝物的微孔作為負面控制，同時含有 CRP 抗原的微孔作為正面樣本。

當完成化驗時，取出一半桿子，並以反射閱讀器測量偵檢線上的強度。結果如第四圖所示，此顯示強度(在偵檢線區域中的圖素)與分析物濃度的比較。如所示，在低 CRP 濃度中發生“鈎扣效果”，即約 250 至 500 ng/公撮。

範例 4

為了比較目的，此依照本發明不利用非特定連結來形成化驗設備。最初，探針由結合具有尺寸為 40 nm 單株抗體 Mab 5811 的金製顆粒(在波長維 530 nm，吸收率=1)形成。欲形成化驗設備，Millipore HF 120 硝化纖維素薄膜疊成具有長度大約微 30 公分的一致托卡。Aqueous CelQuat® 100-H(獲自 National Starch & Chemical, Inc.的纖維素聚合電解質衍生物)溶液剝成薄膜，以形成一控制線。C-反應蛋白的單株抗體 Mab 5804(1 毫克/公撮，此獲自 BiosPacific,

Inc.)固定於多孔薄膜樣本上，以形成一偵檢線。然後在 37°C 溫度中將薄膜樣本乾燥 1 小時。纖維素纖維芯吸襯墊(Millipore 公司)附著至薄膜的其中一端，並切成 4 毫米的二分之一帶子。將二分之一的桿帶放置各種不同微孔，此處為 19 微升的 2% Tween 20 溶液與 1 微升的結合金製顆粒混合，且一起具有 20 微升的 CRP 抗原溶液或 20 微升的 TBS 緩衝物。含有緩衝物的微孔作為負面控制，同時含有 CRP 抗原的微孔作為正面樣本。

當完成化驗時，取出一半桿子，並以反射閱讀器測量偵檢線上的強度。結果如第五圖所示，此顯示強度(在偵檢線區域中的圖素)與分析物濃度的比較。如所示，在低 CRP 濃度中發生“鉤扣效果”，即約 250 至 500 ng/公撮。

儘管發明已詳述關於特定實施例，已根據達成對前文的理解而了解到精通技藝可輕易變更、變動及與這些實施例相當。因此，本發明範圍依附加申請專利範圍及任何同等物評定。

【圖式簡單說明】

本發明全部及能揭發乃包括其最佳方式，此針對通常精通的技藝，此尤其更發表於剩下的說明書中，並參考附圖，如下：

第一圖為本發明的流式化驗設備之一實施例的立體圖；

第二圖為將抗體共價連結至中空探針的一實施例之圖解說明；

第三圖為本發明的流式化驗設備之一實施例的圖解說明；

第四圖為範例 3 結果的圖解敘述；

第五圖為範例 4 結果的圖解敘述；以及

第六圖為範例 1 所利用中空顆粒的 SEM 相片(放大 100 倍)。

本說明書中重複使用的參考特性意圖表示此發明的相同或相似特性或要素。

【主要元件符號說明】

20	flow-through assay device	流式化驗設備
21	rigid material	硬性材料
22	conjugate pad	結合襯墊
23	porous membrane	多孔薄膜
28	wicking pad	芯吸襯墊
31	detection zone	偵檢地區
32	calibration zone	校準地區
41	detection probe	偵檢探針
49	probe/analyte complexes	探針/分析合成物
53	sandwich complexes	三明治合成物
90	probe member	探針構件
91	receptive material	接收材料

五、中文發明摘要：減少分析設備中的鈎扣效果及其偵檢方法

提供偵檢試驗樣本內存有的分析物及數量之薄膜化驗設備。此設備利用含有感興趣分析物之特定連結構件的連結探針。當接觸時，特定連結構件優先與試驗樣本內的分析物合成。剩下與特定連結構件未合成的多餘分析物經歷未特定連結，比如疏水性範圍。結果，限制未合成分析物在設備的偵檢地區中與合成分析物競爭的能力。因此，在簡單、有效率及較便宜的方式中限制“偽陰性”的發生率。

六、英文發明摘要：REDUCTION OF THE HOOK EFFECT IN ASSAY DEVICES

A membrane-based assay device for detecting the presence or quantity of an analyte residing in a test sample is provided. The device utilizes conjugated probes that contain a specific binding member for the analyte of interest. The specific binding member preferentially complexes with the analyte within a test sample when contacted therewith. Excess analyte that remains uncomplexed with the specific binding member undergoes non-specific binding, such as to compete with the complexed analyte at the detection zone of the device is restricted. Thus, the incidence of “false negatives” is limited in a simple, efficient, and relatively inexpensive manner.

十、申請專利範圍：

1. 一種偵檢試驗樣本內存有的分析物及數量的方法，該方法包含：
 - i) 提供流式化驗設備，此包含與偵檢探針聯繫的多孔薄膜，此可產生一偵檢信號，該偵檢探針與分析物的特定黏結構件結合，該多孔薄膜定義為固定接收材料內的偵檢地區；
 - ii) 將含有分析物的試驗樣本與該結合偵檢探針接觸，因此形成分析物/探針合成物及未合成分析物；
 - iii) 允許該未合成分析物接受非特定黏結；以及
 - iv) 在該分析物/探針合成物與偵檢地區內的接受材料之間形成三元合成物，其中接受材料剩下較自由的未合成分析物。
2. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該未合成分析物未特定連結至至少該連結偵檢探針部分上的範圍。
3. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中含有個別範圍的結合探針定義由被該探針佔領 20% 至 100% 空間體積所構成的中空內側，該探針具有一內側表面及一外側表面。
4. 如申請專利範圍第 3 項的方法，其中該內側表面包括該範圍。
5. 如申請專利範圍第 3 項的方法，其中該結合偵檢探針為球形。
6. 如申請專利範圍第 3 項的方法，其中該結合偵檢探針由芯式聚合物及殼式聚合物形成。
7. 如申請專利範圍第 3 項的方法，其中該結合偵檢探針由靜電層沉積形成。
8. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該範圍為疏水性。
9. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該結合偵檢探針定義為具有平均尺寸小於 100 nm 的氣孔。
10. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該結合偵檢探針的平均尺寸範圍為 0.1 nm 至 100 微米。
11. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該結合偵檢探針包含一物質，此選自由色素原、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、微脂囊及其組合所組成。

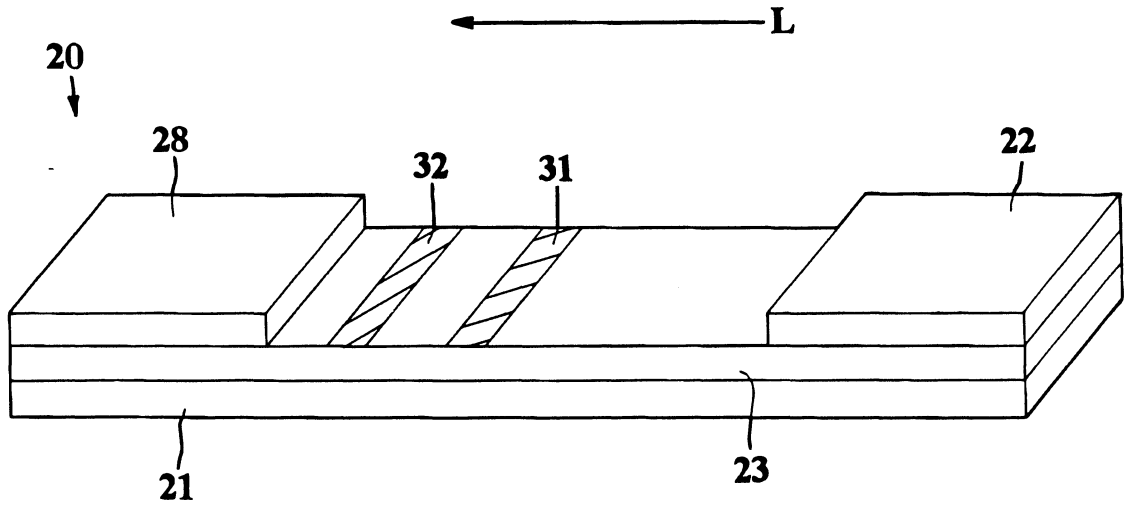
12. 一種偵檢試驗樣本內存有的分析物及數量的方法，該方法包含：
 - i) 提供流式化驗設備，此包含與偵檢探針聯繫的多孔薄膜，此可產生一偵檢信號，該偵檢探針與分析物的特定黏結構件結合，並個別定義為由該探針佔領20%至100%空間體積所構成的中空內側，該探針具有一內側表面及一外側表面，該多孔薄膜定義為固定接收材料內的偵檢地區；
 - ii) 將含有分析物的試驗樣本與該結合偵檢探針接觸，因此形成分析物/探針合成物及未合成分析物；
 - iii) 允許該未合成分析物非明確連結至該結合偵檢探針的內側表面；
以及
 - iv) 在該分析物/探針合成物與偵檢地區內的接受材料之間形成三元合成物，其中接受材料剩下較自由的未合成分析物。
13. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中至少該內側表面部分為疏水性。
14. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該結合偵檢探針定義為具有平均尺寸小於 100 nm 的氣孔。
15. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該結合偵檢探針為球形。
16. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該結合偵檢探針由一芯式聚合物及一殼式聚合物形成。
17. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該結合偵檢探針由靜電層沉積形成。
18. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該結合偵檢探針的平均尺寸範圍為 0.1 nm 至 100 微米。
19. 一種偵檢試驗樣本內存有的分析物及數量的流式化驗設備，該流式化驗設備包含與偵檢探針聯繫的多孔薄膜，此可產生一偵檢信號，該偵檢探針與分析物的特定連結構件結合，並在接觸時構成與試驗樣本中的分析物結合，使得形成分析物/探針合成及未合成分析物，該結合偵檢探針進一步包含未明確連結至該未合成分析物的範圍，該多孔薄膜定義為固定接受材料內的偵檢地區，此構成連結至

該分析物/探針合成物，其中該結合偵檢探針可產生一偵檢信號，同時在該偵檢區域內，使得可自該偵檢信號測定試驗樣本內的分析物數量。

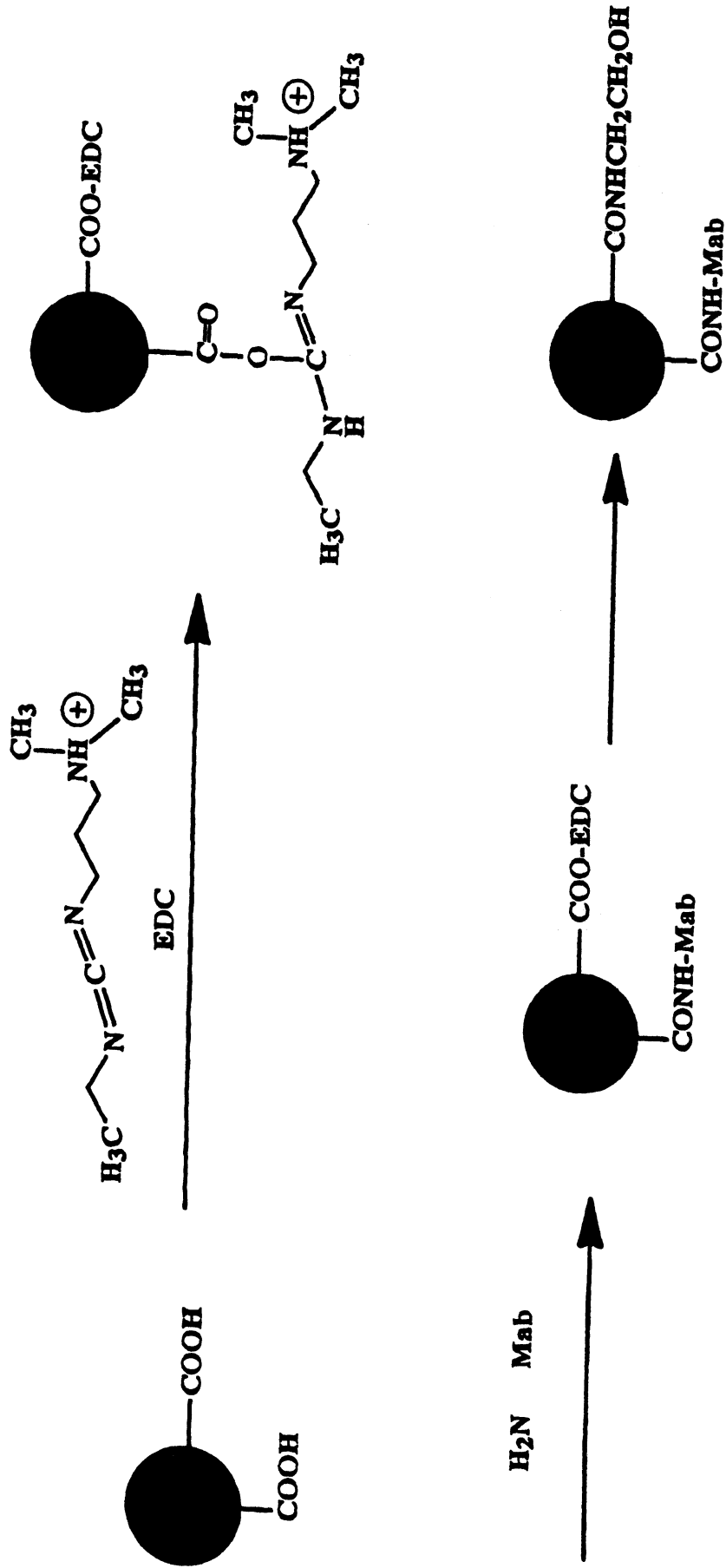
20. 如申請專利範圍第 19 項的流式化驗設備，其中該結合偵檢探針含有個別定義為由該探針佔領 20%至 100%空間體積所構成的中空內側範圍，該探針具有一內側表面及一外側表面。
21. 如申請專利範圍第 20 項的流式化驗設備，其中該內側表面包括該範圍。
22. 如申請專利範圍第 20 項的流式化驗設備，其中該結合偵檢探針為球形。
23. 如申請專利範圍第 20 項的流式化驗設備，其中該結合偵檢探針由一芯式聚合物及一殼式聚合物形成。
24. 如申請專利範圍第 20 項的流式化驗設備，其中該結合偵檢探針由靜電層沉積形成。
25. 如申請專利範圍第 19 項的流式化驗設備，其中該範圍為疏水性。
26. 如申請專利範圍第 19 項的流式化驗設備，其中該結合偵檢探針定義為具有平均尺寸小於 100 nm 的氣孔。
27. 如申請專利範圍第 19 項的流式化驗設備，其中該結合偵檢探針的平均尺寸範圍為 0.1 nm 至 100 微米。
13. 如申請專利範圍第 19 項的流式化驗設備，其中該結合偵檢探針包含一物質，此選自由色素原、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、微脂囊及其組合所組成。

13107368

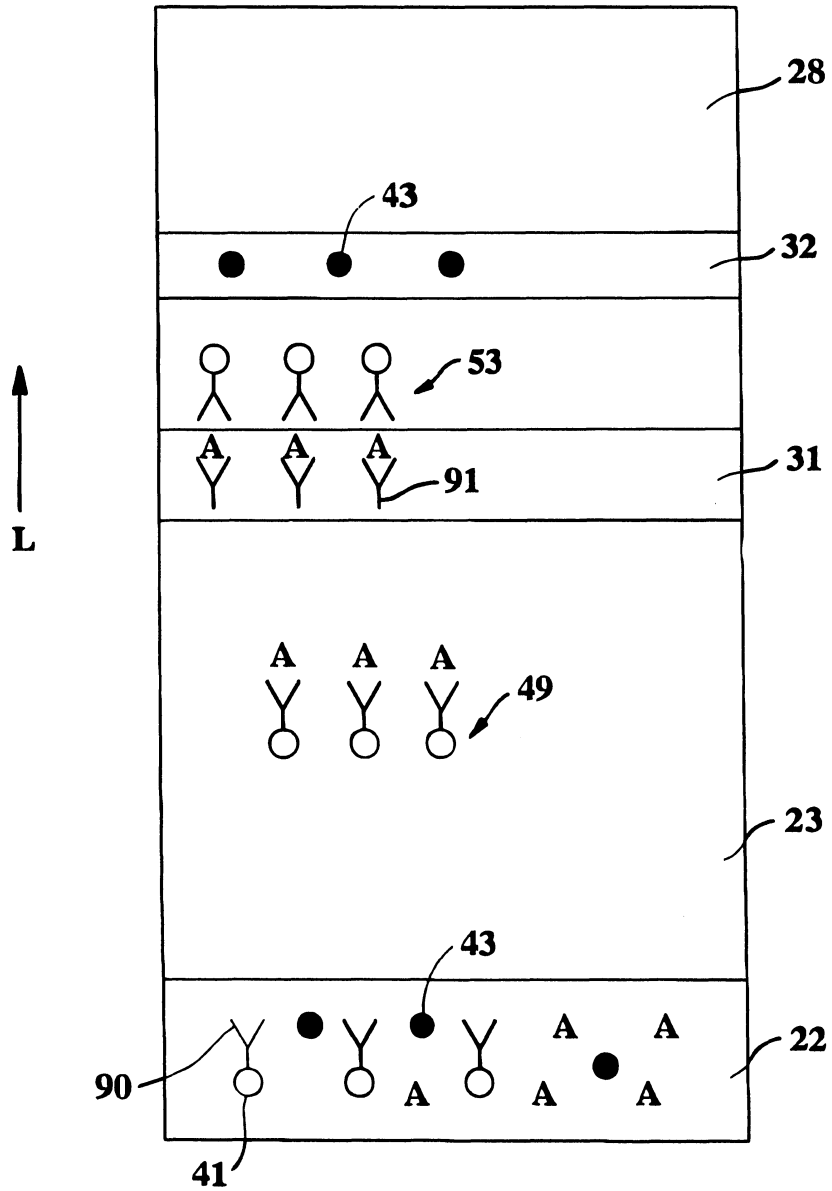
PLATE/GAS



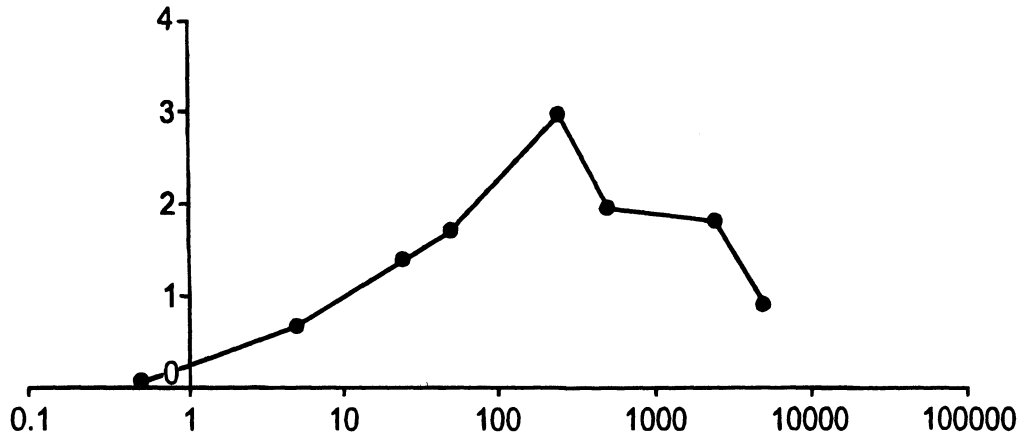
第一圖



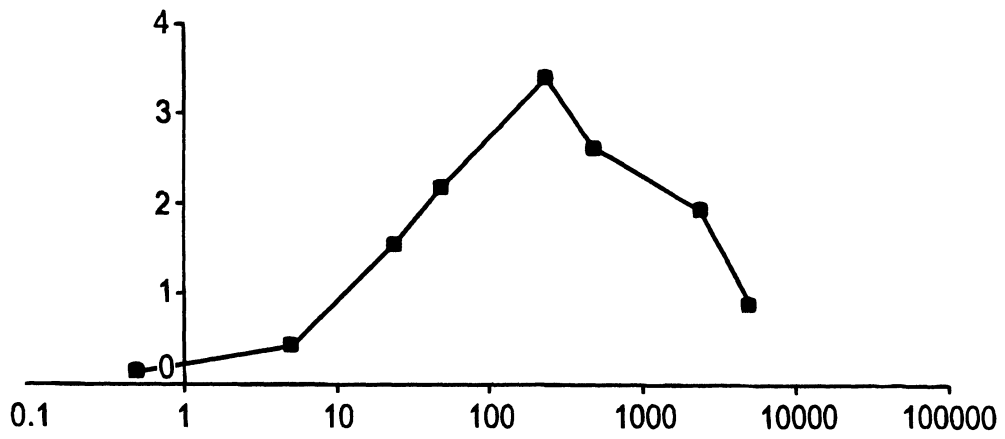
第二圖



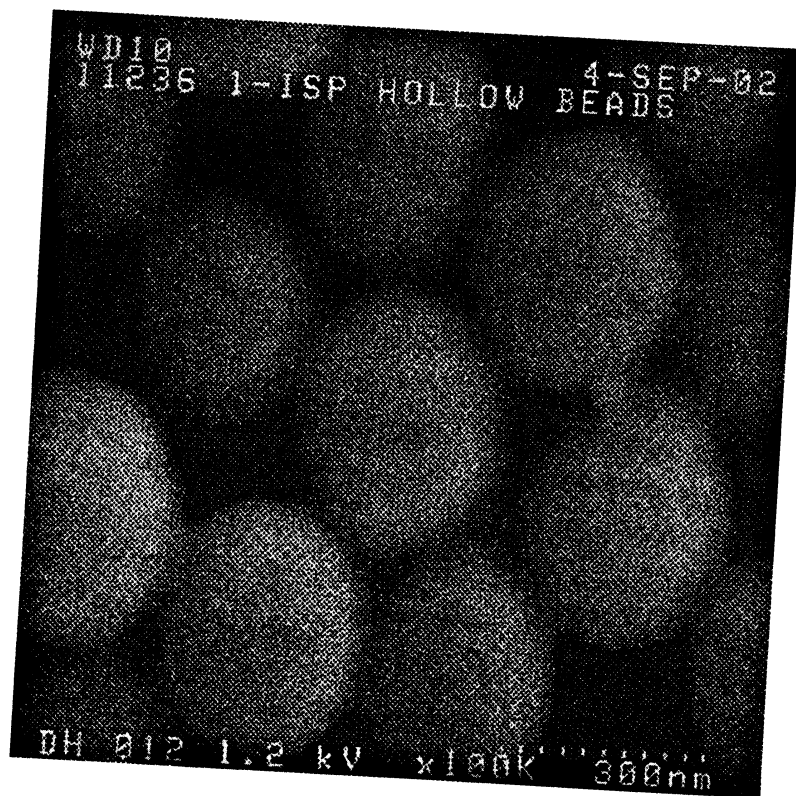
第三圖



第 四 圖



第 五 圖



第六圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(一)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

20	flow-through assay device	流式化驗設備
21	rigid material	硬性材料
22	conjugate pad	結合襯墊
23	porous membrane	多孔薄膜
28	wicking pad	芯吸襯墊
31	detection zone	偵檢地區
32	calibration zone	校準地區

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：