



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2011년09월21일  
 (11) 등록번호 10-1066707  
 (24) 등록일자 2011년09월15일

- (51) Int. Cl.  
*G01N 33/543* (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)  
*G01N 33/50* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2006-7008703  
 (22) 출원일자(국제출원일자) 2004년05월05일  
 심사청구일자 2008년12월23일  
 (85) 번역문제출일자 2006년05월04일  
 (65) 공개번호 10-2006-0126964  
 (43) 공개일자 2006년12월11일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2004/014000  
 (87) 국제공개번호 WO 2005/057214  
 국제공개일자 2005년06월23일
- (30) 우선권주장  
 10/719,976 2003년11월21일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 US20030124739 A1\*  
 US6509196 A  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 킴벌리-클라크 월드와이드, 인크.  
 미국 위스콘신주 (우편번호: 54957-0349) 니나 노  
 쓰 레이크 스트리트 401
- (72) 발명자  
 송, 수웨동  
 미국 30076 조지아주 로스웰 크라바플 레이크 서  
 클 1135
- (74) 대리인  
 장수길, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 17 항

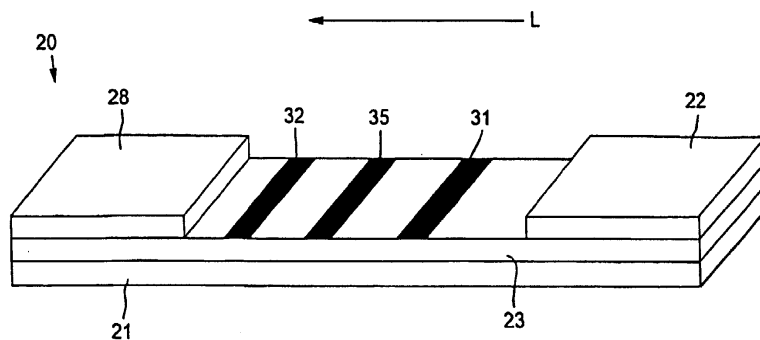
심사관 : 정재철

**(54) 분석 장치의 동적 검출 범위의 확장 방법**

**(57) 요약**

시험 샘플 중에 있는 분석물질의 존재 또는 양을 검출하기 위한 관통흐름 분석 장치가 제공된다. 장치는 검출 대역 및 고정화된 포획제가 그안에 있는 보상 대역을 이용한다. 본 발명자들은 보상 대역의 존재가 확장된 농도 범위에 걸쳐 분석물질의 검출을 가능하게 할 수 있다는 것을 발견하였다. 특히, 보상 대역은 다르게는 분석 장치의 내부 안에서 결합하게 되거나 또는 "자기-소광"을 나타내게 되는 프로브의 결합을 용이하게 한다.

**대표도** - 도1



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

i) 다공성 막이 검출 프로브 및 검량 프로브와 소통하고 있고, 검출 프로브는 분석물질에 대해 특이적인 결합 구성원과 접합되어 있으며, 다공성 막이 제1 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검출 대역, 제2 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 보상 대역, 및 제3 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검량 대역을 형성하고, 보상 대역이 검출 대역의 하류에 위치하고 있는, 다공성 막을 포함하는 관통흐름 분석 장치를 제공하는 단계;

ii) 분석물질을 함유하는 시험 샘플을 접합된 검출 프로브 및 검량 프로브와 접촉시키는 단계;

iii) 검출 대역에서 생성된 검출 신호 세기, 보상 대역에서 생성된 보상 신호 세기, 및 검량 대역에서 생성된 검량 신호 세기를 측정하는 단계;

iv) 보상 신호의 세기가 검출 신호의 세기에 반비례하는, 보상 신호와 검출 신호의 세기를 비교하는 단계; 및

v) 검량 신호의 세기가 검출 신호 및 검량 신호의 세기들에 비하여 일정한, 검량 신호의 세기로 검출 신호 및 보상 신호의 비교된 세기들을 검량하는 단계

를 포함하는, 시험 샘플에 있는 분석물질의 존재 또는 양의 검출 방법.

**청구항 2**

i) 다공성 막이 광학 검출 프로브 및 광학 검량 프로브와 소통하고 있고, 광학 검출 프로브는 분석물질에 대해 특이적인 결합 구성원과 접합되어 있으며, 다공성 막이 제1 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검출 대역, 제2 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 보상 대역, 및 제3 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검량 대역을 형성하고, 보상 대역이 검출 대역의 하류에 위치하고 있는, 다공성 막을 포함하는 관통흐름 분석 장치를 제공하는 단계;

ii) 분석물질을 함유하는 시험 샘플을 접합된 광학 검출 프로브 및 광학 검량 프로브와 접촉시키는 단계;

iii) 검출 대역에서 생성된 검출 신호 세기, 보상 대역에서 생성된 보상 신호 세기, 및 검량 대역에서 생성된 검량 신호 세기를 광학적으로 측정하는 단계;

iv) 보상 신호의 세기가 검출 신호의 세기에 반비례하는, 보상 신호와 검출 신호의 세기를 비교하는 단계; 및

v) 검량 신호의 세기가 검출 신호 및 검량 신호의 세기들에 비하여 일정한, 검량 신호의 세기로 검출 신호 및 보상 신호의 비교된 세기들을 검량하는 단계

를 포함하는, 시험 샘플에 있는 분석물질의 존재 또는 양의 검출 방법.

**청구항 3**

제1 또는 2항에 있어서, 상기 검출 대역 및 상기 보상 대역에서 상기 접합된 검출 프로브를 여기시키는 단계를 추가로 포함하고, 이때 이러한 여기가 상기 접합된 검출 프로브가 상기 검출 신호 및 상기 보상 신호를 방출하게 하는 방법.

**청구항 4**

제1 또는 2항에 있어서, 다수개의 소정의 분석물질 농도에 대하여 검량 신호의 세기에 의해 검량된 보상 신호에 대한 검출 신호의 비를 플롯팅하여 검량 곡선을 생성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 5**

검출 프로브 및 검량 프로브와 소통하고 있는 다공성 막을 포함하고, 이 때 검출 프로브는 분석물질에 대한 특이적 결합 구성원과 접합되어 있고, 다공성 막은

접합된 검출 프로브 또는 그의 착물의 적어도 일부분에 결합하여 일정 세기를 갖는 검출 신호를 생성시키도록 구성된 제1 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검출 대역;

검출 대역을 통과하는 접합된 검출 프로브 또는 그의 착물에 결합하여 일정 세기를 갖는 보상 신호를 생성시키도록 구성된 제2 포획제가 그 안에 고정화되어 있으며 이 때 보상 신호의 세기는 검출 신호의 세기에 반비례하

는, 상기 검출 대역으로부터 하류에 위치하는 보상 대역; 및

검량 프로브에 결합하여 검출 및 보상 신호들의 세기들에 비하여 세기가 일정한 검량 신호를 생성시키도록 구성된 제3 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검량 대역

을 형성하고, 이 때 시험 샘플 내의 분석물질의 양은 상기 검량 신호 세기에 의해 검량되었을 때 상기 보상 신호 세기에 대한 상기 검출 신호 세기의 비에 비례하는, 시험 샘플에 있는 분석물질의 존재 또는 양 검출용 관통흐름 분석 장치.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 집합된 검출 프로브가 발색체, 촉매, 발광 화합물, 방사성 화합물, 시각적 표지, 리포솜, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 7**

제5 또는 6항에 있어서, 상기 집합된 검출 프로브가 발광 화합물을 포함하는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 8**

제5 또는 6항에 있어서, 상기 집합된 검출 프로브가 시각적 표지를 포함하는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 9**

제5 또는 6항에 있어서, 상기 특이적 결합 구성원이 항원, 합텐, 압타머, 1차 또는 2차 항체, 비오틴, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 10**

제5 또는 6항에 있어서, 상기 제1 포획제가 항원, 합텐, 단백질 A 또는 G, 뉴트라비딘, 아비딘, 스트렙타비딘, 캅타비딘, 1차 또는 2차 항체 및 이들의 착물로 이루어진 군으로부터 선택되는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 11**

제5 또는 6항에 있어서, 상기 제2 포획제가 항원, 합텐, 단백질 A 또는 G, 뉴트라비딘, 아비딘, 스트렙타비딘, 캅타비딘, 1차 또는 2차 항체 및 이들의 착물로 이루어진 군으로부터 선택되는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 12**

제5 또는 6항에 있어서, 상기 제2 포획제가 고분자전해질(polyelectrolyte)을 포함하는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 고분자전해질이 알짜 양 전하를 갖는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 고분자전해질이 폴리리신, 폴리에틸렌이민, 에피클로로히드린-관능화 폴리아민 또는 폴리아미도아민, 폴리디알틸디메틸-암모늄 클로라이드, 양이온성 셀룰로스 유도체 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 관통흐름 분석 장치.

**청구항 15**

제12항에 있어서, 상기 고분자전해질이 알짜 음 전하를 갖는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 16**

제5 또는 6항에 있어서, 상기 제3 포획제가 항원, 합텐, 단백질 A 또는 G, 뉴트라비딘, 아비딘, 스트렙타비딘, 캅타비딘, 1차 또는 2차 항체 또는 이들의 착물을 포함하는 관통흐름 분석 장치.

**청구항 17**

제5 또는 6항에 있어서, 상기 분석 장치가 샌드위치-타입 분석 장치인 관통흐름 분석 장치.

**명세서**

**배경 기술**

[0001] 다양한 분석 절차 및 장치가 시험 샘플 중에 존재할 수도 있는 분석물질의 존재 및(또는) 농도를 알아보기 위한 관통흐름(flow-through) 분석에 흔히 사용된다. 예를 들면, 면역학적 분석은 유기체에 대해 병원성이거나 또는 외래인 항원의 존재에 반응하여 항체가 생성되는 면역계의 기전을 이용한다. 이들 항체 및 항원, 즉 면역반응물은 서로 결합할 수 있고, 이에 따라 생물학적 샘플 중에서 그 특정 항원의 존재 또는 농도를 알아보는데 사용될 수 있는 매우 특이적인 반응 기전을 야기시킨다.

[0002] 분석물질들이 분석적으로 검출될 수 있도록 검출가능한 성분으로 표시된 면역반응물을 사용하는 몇몇 공지된 면역학적 분석 방법이 있다. 예를 들면, "샌드위치-타입" 분석은 대표적으로는 분석물질에 대한 특이적인 결합 구성원과 접합된 방사성동위원소 또는 착색된 라텍스와 같은 검출가능한 프로브와 시험 샘플을 혼합하는 것을 포함한다. 접합된 프로브는 분석물질과 착물을 형성한다. 그러면 이들 착물은 항체와 분석물질 사이에 결합이 일어나서 3원 "샌드위치 착물"을 형성하는 고정화된 항체의 대역에 도달하게 된다. 샌드위치 착물은 분석물질의 검출을 위한 대역에 국소화되어 있다. 이 기술은 정량적 또는 반-정량적 결과를 얻는데 사용될 수 있다. 이러한 샌드위치-타입 분석의 몇몇 예는 그럽(Grubb) 등의 미국 특허 제4,168,146호 및 톰(Tom) 등의 미국 특허 제4,366,241호에 기재되어 있다. 다른 기술은 "경쟁적-타입" 분석이다. "경쟁적-타입" 분석에서, 표시는 대표적으로는 샘플 중에 존재하는 임의의 표시되지 않은 분석물질과 항체의 결합에 대해 경쟁하는 표시된 분석물질 또는 분석물질-동족체이다. 경쟁적 분석은 대표적으로는 합텐과 같은 분석물질의 검출에 사용되고, 각 합텐은 1가이며 단지 1개의 항체 분자와 결합할 수 있다. 경쟁적 면역학적 분석 장치의 예는 듀츠(Deutsch) 등의 미국 특허 제4,235,601호, 리오타(Liotta)의 미국 특허 제4,442,204호 및 뷰클러(Buechler) 등의 미국 특허 제 5,208,535호에 기재되어 있다.

[0003] 이들 장치로부터 달성된 이점들에도 불구하고, 많은 종래의 측방향 흐름(lateral flow) 분석은 비교적 높은 분석물질 농도에 노출되었을 때 상당한 부정확성에 맞닥뜨리게 된다. 예를 들면, 광학 검출(예를 들면, 형광, 반사율, 인광 등)에 의존하는 분석은 종종 높은 분석물질 농도에서 부정확하게 된다. 구체적으로, 프로브는 일반적으로 막 장치의 표면 상에 포획될 뿐만 아니라 분석 장치의 내부 안에서 포획된다. 불행하게도, 대부분의 광학 검출 기술은 분석 장치의 내부 안에서 깊숙이 포획된 이들 프로브들을 검출할 수 없다. 또한, 형광 프로브들은 때때로 함께 너무 가까이 놓여질 때 때때로 "자기-소광(self-quenching)"을 나타낸다. 자기-소광은 2개 이상의 형광 물질이 광화학적으로 상호작용하여 서로의 형광을 소광시킬 때 일어나는 공지된 현상이다. 따라서, 형광 프로브는 높은 분석물질 농도에서 자기-소광을 나타내기 시작할 수 있으며, 이것은 실제로 형광 세기의 감소를 초래한다. 이들 문제점들은 종종 검출 범위를 제한시키고 분석물질의 부정확한 검출을 초래한다.

[0004] 이들 또는 다른 문제점들에 대하여, 몇가지 분석 구성형태가 제시되어 왔다. 예를 들면, 칭(Ching)의 EP 0462376은 연속되는 유체 흐름 접촉에서 2개 이상의 한정된 및 표시된 검출 부위를 갖는 고체 상을 포함하는 분석 장치를 설명한다. 제1 검출 부위는 접합체와의 결합에 대해 분석물질과 경쟁할 수 있는 포획제(capture reagent)로 고정화된 포획 부위이다. 제2 검출 부위는 포획 부위를 관통하는 접합체 또는 그의 착물과의 결합에 대해 포획제와는 상이한 접합체 회수제를 포함하는 접합체 회수 부위이다. 시험 샘플 중에 분석물질의 양이 증가함에 따라, 접합체의 더 많은 결합 부위를 분석물질 분자가 차지하고, 더 적은 접합체가 자유로이 포획제와 결합한다. 대신에, 분석물질/접합체 착물은 포획 부위를 지나 접합체 회수 부위로 이동한다. 각 부위에서의 표시의 양의 비교 분석은 시험 샘플 중에서의 분석물질의 양을 나타낸다.

[0005] 그럼에도 불구하고, 정확하면서도 또한 간단하고 비용 효과적인 방식으로 분석 장치의 동적 검출 범위를 확장시키는 방법을 여전히 필요로 하고 있다.

[0006] <발명의 요약>

[0007] 본 발명의 한 실시태양에 따라, 시험 샘플에 있는 분석물질의 존재 또는 양을 검출하기 위한 관통흐름 분석 장치가 개시된다. 관통흐름 분석 장치는 검출 프로브 및 검량 프로브와 소통하고 있는 다공성 막을 포함하고, 이때 검출 프로브는 분석물질에 대한 특이적 결합 구성원과 접합되어 있다. 경우에 따라, 접합된 검출 프로브들은 발색체, 촉매, 발광 화합물(예를 들면, 형광, 인광 등), 방사성 화합물, 시각적 표시, 리포솜, 및 이들의 조

합물로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함할 수 있다. 특이적 결합 구성원은 항원, 합텐, 압타머 (aptamer), 1차 또는 2차 항체, 비오틴, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0008] 다공성 막은 접합된 검출 프로브 또는 그의 착물의 적어도 일부분에 결합하여 일정 세기를 갖는 검출 신호를 생성시키도록 구성된 제1 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검출 대역을 형성한다. 한 실시태양에서, 제1 포획제는 항원, 합텐, 단백질 A 또는 G, 뉴트라비딘, 아비딘, 스트렙타비딘, 캡타비딘, 1차 또는 2차 항체 및 이들의 착물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들면, 제1 포획제는 분석물질과 접합된 검출 프로브 사이에 형성된 착물과 결합할 수 있다.

[0009] 분석 장치의 동적 검출 범위를 추가로 확장하기 위하여, 다공성 막은 또한 검출 대역으로부터 하류에 위치하는 보상 대역을 형성한다. 제2 포획제는 검출 대역을 통과한 접합된 검출 프로브 또는 그의 착물에 결합하여 일정 세기를 갖는 보상 신호를 생성시키도록 구성되고 보상 대역 내에서 고정화된다. 한 실시태양에서, 제2 포획제는 항원, 합텐, 단백질 A 또는 G, 뉴트라비딘, 아비딘, 스트렙타비딘, 캡타비딘, 1차 또는 2차 항체 및 이들의 착물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시태양에서, 제2 포획제는 고분자전해질을 포함한다. 고분자전해질은 양으로 대전되거나, 음으로 대전되거나, 양쪽성 동일 수 있다. 제2 포획제로 선택된 물질과는 무관하게, 보상 신호의 세기는 검출 신호의 세기에 반비례한다. 따라서, 보상 신호 세기에 대한 검출 신호 세기의 비는 분석물질 농도에 비례하고, 따라서 시험 샘플 중의 분석물질의 양을 측정하는데 사용될 수 있다.

[0010] 실제 시험 조건 하에서 검출 및 보상 신호들의 정확성은 자가-검량 기술을 사용하여 추가로 개선될 수 있다. 구체적으로, 다공성 막은 또한 검량 프로브와도 소통하고 있고, 검량 프로브에 결합하여 일정 세기를 갖는 검량 신호를 생성시키도록 구성된 제3 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검량 대역을 포함한다. 검량 신호는 검출 및 보상 신호들의 세기들에 비하여 세기에 있어서 실질적으로 일정하다. 따라서, 검량 신호는 검출 및 보상 신호들을 검량하는데 사용될 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 실시태양에 따라, 시험 샘플 내에 있는 분석물질의 존재 또는 양을 측정하기 위한 방법이 개시된다. 이 방법은

[0012] i) 다공성 막이 검출 프로브 및 검량 프로브와 소통하고 있고, 검출 프로브는 분석물질에 대해 특이적인 결합 구성원과 접합되어 있으며, 다공성 막이 제1 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검출 대역, 제2 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 보상 대역, 및 제3 포획제가 그 안에 고정화되어 있는 검량 대역을 형성하고, 보상 대역이 검출 대역의 하류에 위치하고 있는 다공성 막을 포함하는 관통흐름 분석 장치를 제공하는 단계;

[0013] ii) 분석물질을 함유하는 시험 샘플을 접합된 검출 프로브 및 검량 프로브와 접촉시키는 단계;

[0014] iii) 검출 대역에서 생성된 검출 신호 세기, 보상 대역에서 생성된 보상 신호 세기, 및 검량 대역에서 생성된 검량 신호 세기를 측정하는 단계;

[0015] iv) 보상 신호의 세기가 검출 신호의 세기에 반비례하는, 보상 신호와 검출 신호의 세기를 비교하는 단계; 및

[0016] v) 검량 신호의 세기가 검출 신호 및 검량 신호의 세기들에 비하여 실질적으로 일정한, 검량 신호의 세기로 검출 신호 및 보상 신호의 비교된 세기들을 검량하는 단계

[0017] 를 포함한다. 경우에 따라, 이 방법은 다수개의 소정의 분석물질 농도에 대하여 검량 신호의 세기에 의해 검량된 보상 신호 세기에 대한 검출 신호 세기의 비를 플롯팅함으로써 검량 곡선을 생성시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 특징 및 측면들은 아래에서 보다 상세하게 논의된다.

**발명의 상세한 설명**

[0025] 정의

[0026] 본원에서 사용된 용어 "분석물질"은 일반적으로 검출하고자 하는 물질을 말한다. 예를 들면, 분석물질은 항원성 물질, 합텐, 항체 및 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 분석물질은 독소, 유기 화합물, 단백질, 펩티드, 미생물, 아미노산, 핵산, 호르몬, 스테로이드, 비타민, 약물(치료 목적으로 투여된 것 뿐만 아니라 불법으로 투여된 것 포함), 약물 중간체 또는 부산물, 박테리아, 바이러스 입자 및 상기한 임의의 물질의 대사산물 또는 이들에 대한 항체를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 일부 분석물질의 특정 예는 페리틴; 크레아티닌 키나제 MB(CK-MB); 디곡신; 페니토인; 페노바르비탈; 카르바마제핀; 반코마이신; 겐타마이신; 테오필린; 발프로인산; 퀴니딘; 황체 호르몬(LH); 난포 자극 호르몬(FSH); 에스트라디올, 프로게스테론; C-반응성 단백질; 리포칼린;



IgE 항체; 시토킨; 비타민 B2 미소-글로불린; 글리케이티드(glycated) 헤모글로빈(Gly.Hb); 코르티솔; 디기톡신; N-아세틸프로카인아미드(NAPA); 프로카인아미드; 풍진에 대한 항체, 예를 들면 풍진-IgG 및 풍진-IgM; 독소플라스마병에 대한 항체, 예를 들면 독소플라스마병-IgG(Toxo-IgG) 및 독소플라스마병-IgM(Toxo-IgM); 테스토스테론; 살리실레이트; 아세타미노펜; B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg); B형 간염 코어 항원에 대한 항체, 예를 들면 항-B형 간염 코어 항원 IgG 및 IgM(Anti-HBC); 인간 면역 결핍 바이러스 1 및 2(HIV 1 및 2); 인간 T-세포 백혈병 바이러스 1 및 2(HTLV); B형 간염 e 항원(HBeAg); B형 간염 e 항원에 대한 항체(Anti-HBe); 인플루엔자 바이러스; 갑상선 자극 호르몬(TSH); 티록신(T4); 총 트리요오도티로닌(총 T3); 유리 트리요오도티로닌(유리 T3); 암배아 항원(CEA); 지단백질, 콜레스테롤 및 트리글리세리드; 및 알파 페토단백질(AFP)을 포함한다. 남용 약물 및 규제 약물은 암페타민; 메탐페타민; 바르비투레이트, 예를 들면 아모바르비탈, 세코바르비탈, 펜토바르비탈, 페노바르비탈, 및 바르비탈; 벤조디아제핀, 예를 들면 리브륨 및 발륨; 칸나비노이드, 예를 들면 하쉬쉬 및 마리화나; 코카인; 펜타닐; LSD; 메타쿠알론; 아편제, 예를 들면 헤로인, 모르핀, 코데인, 히드로모르폰, 히드로코돈, 메타돈, 옥시코돈, 옥시모르폰 및 아편; 펜시클리딘; 및 프로폭시헨을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 다른 잠재적인 분석물질들은 에버하트(Everhart) 등의 미국 특허 제6,436,651호 및 톰 등의 미국 특허 제4,366,241호에 기재되어 있을 것이다.

[0027] 본원에서 사용된 용어 "시험 샘플"은 일반적으로 분석물질을 함유할 것으로 의심되는 물질을 말한다. 시험 샘플은 예를 들면 공급원으로부터 직접 얻은 물질 뿐만 아니라, 여과, 침전, 희석, 증류, 혼합, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 예로 들 수 있지만 이들로 제한되는 것은 아닌 기술을 사용하여 전처리된 물질을 포함할 수 있다. 시험 물질은 생물학적 공급원, 예를 들면 혈액, 간질액, 타액, 눈 렌즈액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 유액, 복수액, 점액, 윤활액, 복막액, 질액, 양수 등을 포함하는 생리학적 유체로부터 유래될 수 있다. 생리학적 유체 외에, 다른 액체 샘플, 예를 들면 물, 식품 등이 사용될 수 있다. 또한, 분석물질을 함유할 것으로 의심되는 고체 물질도 또한 시험 샘플로서 사용될 수 있다.

[0028] 상세한 설명

[0029] 이제 본 발명의 다양한 실시태양들에 대하여 보다 상세하게 살펴보고자 하며, 이들 중 하나 이상의 예들이 하기 기재되어 있다. 각 예는 본 발명의 한정이 아닌 본 발명의 설명으로 제공된다. 사실, 본 발명에서 본 발명의 범위 또는 본질에서 벗어나지 않고서 다양한 변형 및 변화들이 이루어질 수 있다는 것은 당 업계의 통상의 숙련인에게 명백할 것이다. 예를 들면, 한 실시태양의 일부분으로 설명되거나 또는 예시된 특징들이 다른 실시태양에서 사용되어 또 다른 실시태양을 생성시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 첨부된 특허 청구의 범위 및 이들의 등가물의 범위 내에 속하는 이러한 변형 및 변화들을 포함하고자 한다.

[0030] 일반적으로, 본 발명은 시험 샘플 중에 있는 분석물의 존재 또는 양을 검출하기 위한 관통흐름 분석에 관한 것이다. 장치는 고정화된 포획제가 그 안에 들어있는 보상 대역 및 검출 대역을 이용한다. 본 발명자들은 보상 대역의 존재가 확장된 농도 범위에 걸쳐 분석물질의 검출을 가능하게 할 수 있음을 발견하였다. 특히, 보상 대역으로부터의 신호는 분석 장치의 내부에 너무 깊숙이 매립된 프로브 및(또는) 자기-소광을 나타내는 프로브로부터 발생하는 손실 신호를 보상할 수 있다.

[0031] 도 1을 살펴보면, 예를 들면 본 발명에 따라 형성될 수 있는 샌드위치 타입의 관통흐름 분석 장치(20)의 한 실시태양이 이제 더욱 상세하게 설명될 것이다. 나타난 바와 같이, 장치(20)은 임의로 경질 물질(21)에 의해 지지되는 다공성 막(23)을 함유한다. 일반적으로, 다공성 막(23)은 이를 통해 시험 샘플이 통과할 수 있는 임의의 다양한 물질로부터 제조될 수 있다. 예를 들면, 다공성 막(23)을 형성하는데 사용된 물질은 합성적으로 변형된 천연, 합성 또는 천연 발생 물질, 예를 들면 다당류(예를 들면, 셀룰로스 물질, 예를 들면 종이 및 셀룰로스 유도체, 예를 들면 셀룰로스 아세테이트 및 니트로셀룰로스); 폴리에테르 술폰; 폴리에틸렌; 나일론; 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF); 폴리에스테르; 폴리프로필렌; 실리카; 무기 물질, 예를 들면 활성감소된 알루미늄, 규조토, MgSO<sub>4</sub>, 또는 비닐 클로라이드, 비닐 클로라이드-프로필렌 공중합체, 및 비닐 클로라이드-비닐 아세테이트 공중합체와 같은 중합체와, 다공성 중합체 매트릭스 내에 균일하게 분산된 다른 무기 미분 물질; 직포, 천연 발생(예를 들면, 면) 및 합성(예를 들면, 나일론 또는 레이온); 다공성 겔, 예를 들면 실리카겔, 아가로스, 벡스트란, 및 젤라틴; 중합체 필름, 예를 들면 폴리아크릴아미드 등을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 한 특정 실시태양에서, 다공성 막(23)은 니트로셀룰로스 및(또는) 폴리에테르 술폰 물질로부터 제조된다. 용어 "니트로셀룰로스"는 셀룰로스의 질산 에스테르를 말하고, 이것은 니트로셀룰로스 단독이거나 또는 질산 및 다른 산, 예를 들면 1 내지 7개의 탄소 원자를 갖는 알파 카르복실산의 혼합된 에스테르를 말하는 것으로 이해되어야 한다.

- [0032] 장치(20)은 또한 흡상 패드(28)을 포함할 수 있다. 흡상 패드(28)은 일반적으로 정체 다공성 막(23)을 통해 이동된 유체를 수용한다. 당 업계에 공지되어 있는 바와 같이, 흡상 패드(28)은 모관 작용 및 막(23)을 통과하는 유체 흐름을 촉진시키는데 있어서 도움이 될 수 있다.
- [0033] 시험 샘플 내에서 분석물질의 검출을 개시하기 위하여, 사용자는 시험 샘플을 다공성 막(23)의 일부분에 직접 적용할 수 있고, 시험 샘플은 막을 통과한 다음 도 1에서 화살표 "L"로 예시되는 방향으로 이동할 수 있다. 다르게는, 시험 샘플을 먼저 다공성 막(23)과 유체 소통하고 있는 샘플 패드(나타나있지 않음)에 먼저 적용할 수 있다. 샘플 패드를 형성하는데 사용될 수 있는 몇 적합한 물질은 니트로셀룰로스, 셀룰로스, 다공성 폴리에틸렌 패드, 및 유리 섬유 여과지를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 경우에 따라, 샘플 패드는 또한 1개 이상의 분석 전처리 시약(확산적으로 또는 비확산적으로 부착됨)을 함유할 수도 있다.
- [0034] 예시된 실시태양에서, 시험 샘플은 샘플 패드(나타나있지 않음)로부터 샘플 패드의 한 단부와 소통하게 놓이는 접합체 패드(22)로 이동한다. 접합체 패드(22)는 시험 샘플이 통과할 수 있는 물질로 이루어진다. 예를 들면, 한 실시태양에서, 접합체 패드(22)는 유리 섬유로 이루어진다. 비록 단지 1개의 접합체 패드(22)만이 나타나있더라도, 다른 접합체 패드들도 또한 본 발명에 사용될 수 있음을 알아야 한다.
- [0035] 시험 샘플 내 분석물질의 존재 또는 부재의 정확한 검출을 용이하게 하기 위하여, 소정량의 검출 프로브를 장치(20)의 다양한 위치에서 적용한다. 가시적으로 또는 계측 장치에 의해 검출될 수 있는 신호를 일반적으로 생성할 수 있는 임의의 물질이 검출 프로브로서 사용될 수 있다. 각종 적합한 물질은 발색체; 촉매; 발광 화합물(예를 들면, 형광, 인광 등); 방사성 화합물; 콜로이드성 금속(예를 들면 금) 및 비금속성 입자, 염료 입자, 효소 또는 기질, 또는 유기 중합체 라텍스 입자를 포함하는 시각적 표지; 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 검출 프로브로서 사용하기 적합한 몇몇 효소는 본원에서 모든 목적에 대해 그 전체를 참고문헌으로 인용하고 있는 리트만(Litman) 등의 미국 특허 제4,275,149호에 개시되어 있다. 효소/기질 계의 한 예는 효소 알칼리성 포스파타제 및 기질 니트로 블루 테트라졸륨-5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트 또는 이의 유도체 또는 동족체, 또는 기질 4-메틸움벨리페릴-포스페이트이다. 다른 적합한 검출 프로브는 본원에서 모든 목적에 대해 그 전체를 참고문헌으로 인용하고 있는 조우(Jou) 등의 미국 특허 제5,252,459호 및 타차(Tarcha) 등의 미국 특허 제5,670,381호에 개시되어 있다.
- [0036] 몇몇 실시태양에서, 검출 프로브는 검출가능한 신호를 생성시키는 형광 화합물을 함유할 수 있다. 형광 화합물은 형광 분자, 중합체, 덴드리머, 입자 등일 수 있다. 적합한 형광 물질의 몇몇 실시예는 예를 들면 플루오레세인, 유로퓸 킬레이트, 피코빌리프로테인, 로다민 및 이들의 유도체 및 동족체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0037] 상기한 바와 같은 검출 프로브는 단독으로 또는 미립자(때로는 "비드" 또는 "마이크로비드"로 언급됨)와 함께 사용될 수 있다. 예를 들면, 천연 발생 미립자, 예를 들면 핵, 마이크로플라즈마, 플라즈미드, 플라스틱이드, 포유동물 세포(예를 들면, 적혈구 환형세포), 단세포 미생물(예를 들면, 박테리아), 다당류(예를 들면, 아가로스) 등이 사용될 수 있다. 추가로, 합성 미립자도 또한 이용될 수 있다. 예를 들면, 한 실시태양에서는, 형광 또는 착색 염료로 표지된 라텍스 미립자가 사용된다. 비록 임의의 라텍스 미립자가 본 발명에 사용될 수 있더라도, 라텍스 미립자는 대표적으로는 폴리스티렌, 부타디엔 스티렌, 스티렌아크릴-비닐 삼원공중합체, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리에틸메타크릴레이트, 스티렌-말레산 무수물 공중합체, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐피리딘, 폴리디비닐벤젠, 폴리부틸렌테레프탈레이트, 아크릴로니트릴, 비닐 클로라이드-아크릴레이트 등, 또는 이들의 알데히드, 카르복실, 아미노, 히드록실 또는 히드라지드 유도체로부터 제조된다. 다른 적합한 미립자들은 본원에서 모든 목적에 대해 그 전체를 참고문헌으로 인용하고 있는 조우 등의 미국 특허 제5,252,459호 및 타차 등의 미국 특허 제5,670,381호에 개시되어 있다. 적합한 형광 입자들의 상업적으로 입수가능한 예는 몰레큘러 프로브즈, 인크.(Molecular Probes, Inc.)에 의해 상품명 "플루오스피어(FluoSphere)"(Red 580/605) 및 "트랜스플루오스피어(TransFluoSphere)"(543/620) 하에 시판되는 형광 카르복실화 미소구, 뿐만 아니라 역시 몰레큘러 프로브즈, 인크.에 의해 시판되는 "텍사스 레드(Texas Red)" 5- 및 6-카르복시테트라메틸로다민을 포함한다. 또한, 적합한 착색된 라텍스 미립자의 상업적으로 입수가능한 예는 뱅스 라보레이토리, 인크.(Bang's Laboratory, Inc.)에 의해 시판되는 카르복실화 라텍스 비드를 포함한다.
- [0038] 이용될 때, 입자들의 형태는 일반적으로 변할 수 있다. 한 구체적인 실시태양에서, 예를 들면 입자들은 그 형태에 있어 구형이다. 그러나, 판, 봉, 디스크, 막대, 관, 불규칙 형태 등과 같은 다른 형태도 또한 본 발명에 의해 의도된다는 것을 알아야 한다. 또한, 입자의 크기 또한 변할 수 있다. 예를 들면, 입자의 평균 크기(예를 들면, 직경)은 약 0.1 나노미터 내지 약 1,000 마이크로, 몇몇 실시태양에서는 약 0.1 나노미터 내지 약 100

미크론 및 몇몇 실시태양에서는, 약 1 나노미터 내지 약 10 미크론 범위일 수 있다. 예를 들면, "미크론-스케일" 입자가 종종 바람직하다. 이용될 때, 이러한 "미크론-스케일" 입자들은 약 1 미크론 내지 약 1,000 미크론, 일부 실시태양에서는 약 1 미크론 내지 약 100 미크론, 및 일부 실시태양에서는 약 1 미크론 내지 약 10 미크론의 평균 크기를 가질 수 있다. 마찬가지로, "나노-스케일" 입자 또한 이용될 수 있다. 이러한 "나노-스케일" 입자들은 약 0.1 내지 약 10 나노미터, 일부 실시태양에서는 약 0.1 내지 약 5 나노미터, 및 일부 실시태양에서는 약 1 내지 약 5 나노미터의 평균 크기를 가질 수 있다.

[0039] 일부 경우, 검출 프로브를 몇몇 방식으로 이들이 분석물질에 보다 쉽게 결합할 수 있도록 변형시키는 것이 바람직하다. 이러한 경우, 검출 프로브는 여기에 접착되어 접합된 프로브를 형성하는 특정 특이적 결합 구성원으로 변형될 수 있다. 특이적 결합 구성원은 일반적으로 특이적 결합 쌍, 즉 분자들 중 하나가 제2 분자에 화학적으로 및(또는) 물리적으로 결합되는 2개의 상이한 분자들의 한 구성원을 말한다. 예를 들면, 면역반응성 특이적 결합 구성원은 항원, 합텐, 압타머, 항체(1차 또는 2차) 및 이들의 착물(재조합 DNA 방법 또는 펩티드 합성에 의해 형성된 것 포함)을 포함할 수 있다. 항체는 단일클론 또는 다중클론 항체, 재조합 단백질 또는 이들의 혼합물(들) 또는 단편(들), 뿐만 아니라 항체 및 다른 특이적 결합 구성원의 혼합물일 수 있다. 이러한 항체의 제조 및 이들의 특이적 결합 구성원으로서의 사용 적합성에 대한 세부사항들은 당 업계의 통상의 숙련인에게 공지되어 있다. 다른 일반적인 특이적 결합 쌍은 비오틴과 아비딘(또는 이들의 유도체), 비오틴과 스트렙타비딘, 탄수화물과 렉틴, 상보적 뉴클레오티드 서열들(표적 핵산 서열을 검출하기 위해 DNA 혼성화 분석에 사용된 프로브 및 포획 핵산 서열 포함), 상보적 펩티드 서열들(재조합 방법에 의해 형성된 것 포함), 이펙터와 수용체 분자, 호르몬과 호르몬 결합 단백질, 효소 보조인자와 효소, 효소 억제제와 효소 등을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 게다가, 특이적 결합 쌍은 원래의 특이적 결합 구성원의 동족체인 구성원을 포함할 수 있다. 예를 들면, 분석물질의 유도체 또는 단편, 즉 분석물질-동족체는 이것이 분석물질과 공통적인 에피토프를 1개 이상 갖는 한 사용될 수 있다.

[0040] 특이적 결합 구성원은 일반적으로 다양한 공지된 기술들 중 임의의 것을 사용하여 검출 프로브에 부착될 수 있다. 예를 들면, 특이적 결합 구성원의 검출 프로브(예를 들면, 입자)에 대한 공유적 부착은 카르복실, 아미노, 알데히드, 브로모아세틸, 요오도아세틸, 티올, 에폭시 및 다른 반응성 또는 연결 관능기, 뿐만 아니라 잔류 유리 라디칼 및 라디칼 양이온을 사용하여 달성될 수 있으며, 이를 통해 단백질 커플링 반응이 달성될 수 있다. 표면 관능기는 또한 검출 프로브의 표면이 비교적 높은 표면 농도의 극성 기들을 함유할 수 있기 때문에 관능화된 공단량체로서 혼입될 수 있다. 또한, 폴리(티오펜올)과 같이 특정 경우에, 비록 검출 프로브가 종종 합성 후에 관능화되지만, 미립자는 추가의 변형을 필요로 하지 않고서 단백질과 직접 공유 연결할 수 있다. 예를 들면, 도 2를 살펴보면, 입자-함유 검출 프로브를 공유적으로 접합시키기 위한 본 발명의 한 실시태양이 예시된다. 나타낸 바와 같이, 접합의 제1 단계는 카르보다이미드를 사용한 프로브 상의 카르복실기의 활성화이다. 제2 단계에서, 활성화된 카르복실산 기들은 항체의 아미노기와 반응하여 아미드 결합을 형성한다. 활성화 및(또는) 항체 커플링은 완충제, 예를 들면 포스페이트-완충된 염수(PBS)(예를 들면 pH 7.2) 또는 2-(N-모르폴리노)에탄 술폰산(MES)(예를 들면, pH 5.3) 중에서 일어날 수 있다. 나타낸 바와 같이, 생성되는 검출 프로브는 이어서 예를 들면 임의의 남아있는 활성화 부위를 차단하기 위하여 에탄올아민으로 블로킹될 수 있다. 전반적으로, 이 방법은 접합된 검출 프로브를 형성하는데, 여기서 항체는 프로브에 공유적으로 부착된다. 공유 결합 외에, 다른 부착 기술들, 예를 들면 물리적 흡착 또한 본 발명에 이용될 수 있다.

[0041] 다시 도 1을 살펴보면, 분석 장치(20)은 또한 접합된 검출 프로브에 결합할 수 있는 제1 포획체가 그 안에 고정되어 있는 검출 대역(31)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 일부 실시태양에서, 제1 포획체는 생물학적 포획제일 수 있다. 이러한 생물학적 포획체는 당 업계에 공지되어 있고, 항원, 합텐, 단백질 A 또는 G, 뉴트라비딘, 아비딘, 스트렙타비딘, 캡타비딘, 1차 또는 2차 항체(예를 들면, 다중클론, 단일클론 등) 및 이들의 착물을 포함할 수 있지만 이들로 제한되지는 않는다. 많은 경우, 이들 생물학적 포획체는 검출 프로브 상에 존재하는 특이적 결합 구성원(예를 들면, 항체)에 결합할 수 있는 것이 바람직하다. 제1 포획체는 분석물질과 접합된 검출 프로브 사이에 형성된 착물에 대한 고정 결합 부위로서 제공된다. 특이적으로, 분석물질, 예를 들면 항체, 항원 등은 대표적으로는 2개 이상의 결합 부위(예를 들면, 에피토프)를 갖는다. 검출 대역(31)에 도달하면, 이들 결합 부위들 중 하나는 접합 프로브의 특이적 결합 구성원이 차지한다. 그러나, 분석물질의 유리 결합 부위는 고정화된 포획체에 결합할 수 있다. 고정화된 포획체에 결합될 때, 착물화된 프로브는 새로운 3원 샌드위치 착물을 형성한다.

[0042] 검출 대역(31)은 일반적으로 사용자가 시험 샘플 내의 특정 분석물질의 농도를 더 잘 결정할 수 있도록 임의의 수의 독립된 검출 영역들을 제공할 수 있다. 각 영역은 동일한 포획체를 함유할 수 있거나, 또는 다수개의 분



석물질들을 포획하기 위하여 상이한 포획제들을 함유할 수 있다. 예를 들면, 검출 대역(31)은 2개 이상의 독립된 검출 영역들(예를 들면, 선, 점 등)을 포함할 수 있다. 검출 영역들은 분석 장치(20)을 통과하는 시험 샘플의 흐름에 실질적으로 수직인 방향의 선의 형태로 배치될 수 있다. 마찬가지로, 일부 실시태양에서는, 검출 영역들은 분석 장치를 통과하는 시험 샘플의 흐름에 실질적으로 평행인 방향의 선의 형태로 배치될 수 있다.

[0043] 다시 도 1을 살펴보면, 다공성 막(23)은 또한 검출 대역(31)로부터 하류에 위치하는 보상 대역(35)를 포함한다. 보상 대역(35)는 일반적으로 단일의 독립된 영역(예를 들면, 선, 점 등)을 제공하지만, 다수개의 영역들이 본 발명에 의해 분명히 의도된다. 예를 들면, 예시된 실시태양에서, 단일의 선이 이용된다. 보상 대역(35)는 장치(20)을 통과하는 시험 샘플의 흐름에 실질적으로 수직인 방향으로 배치될 수 있다. 마찬가지로, 일부 실시태양에서, 대역(35)는 장치(20)을 통과하는 시험 샘플의 흐름에 실질적으로 평행인 방향으로 배치될 수 있다.

[0044] 그의 구성과는 무관하게, 제2 포획제가 보상 대역(35) 내에서 막(35) 상에 고정화된다. 제2 포획제는 검출 대역(31)에서 제1 포획제에 결합하지 않은 임의의 접합된 검출 프로브 및(또는) 분석물질/접합된 프로브 착물에 대한 고정 결합 부위로서 제공된다. 제2 포획제가 착물화된 및 착물화되지 않은 접합된 검출 프로브 모두에 결합하는 것이 바람직하기 때문에, 제2 포획제는 보통 제1 포획제와 상이하다. 한 실시태양에서, 제2 포획제는 제1 포획제와 상이한 생물학적 포획제(예를 들면, 항원, 항체, 단백질 A 또는 G, 뉴트라비딘, 아비딘, 스트렙타비딘, 캡타비딘, 1차 또는 2차 항체(예를 들면, 다중클론, 단일클론 등) 및 이들의 착물)이다. 예를 들면, 제1 포획제는 단일클론 항체(예를 들면, CRP Mab1)일 수 있지만, 제2 포획제는 아비딘(비글리코실화 52,800-달톤 단백질), 뉴트라비딘(탈글리코실화 아비딘 유도체), 및(또는) 캡타비딘(질화 아비딘 유도체)일 수 있다. 이러한 실시태양에서, 제2 포획제는 제1 포획제의 단일클론 항체(예를 들면, CRP Mab2)와는 상이한 단일클론 항체와 접합된 검출 프로브 상에 포함되거나 또는 비오틴화되거나, 비오틴에 결합할 수 있다.

[0045] 또한, 보상 대역(35)의 제2 포획제에 대하여 다양한 비-생물학적 물질을 이용하는 것도 또한 바람직할 수 있다. 많은 경우, 이러한 비-생물학적 포획제는 남아있는 접합된 검출 프로브 및(또는) 분석물질/접합된 프로브 착물 모두가 보상 대역(35)에 더욱 확실하게 고정화되어 있도록 하는데 특히 바람직할 수 있다. 예를 들면, 일부 경우, 제2 포획제는 고분자전해질을 포함할 수 있다.

[0046] 고분자전해질은 알짜 양 또는 음 전하, 뿐만 아니라 일반적으로 중성인 알짜 전하를 가질 수 있다. 예를 들면, 알짜 양 전하를 갖는 고분자전해질의 일부 적합한 예는 폴리리신(미저리주 세인트 루이스의 시그마-알드리히 케미칼 캄파니., 인크.(Sigma-Aldrich Chemical Co., Inc.)로부터 상업적으로 입수가능), 폴리에틸렌이민; 에피클로로히드린-관능화 폴리아민 및(또는) 폴리아미도아민, 예를 들면 폴리(디메틸아민-코-에피클로로히드린); 폴리디알릴디메틸-암모늄 클로라이드; 양이온성 셀룰로스 유도체, 예를 들면 4차 암모늄 수용성 단량체가 그래프 트된 셀룰로스 유도체 또는 셀룰로스 공중합체; 등을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 한 특정 실시태양에서는, 4차 암모늄 수용성 단량체를 함유하는 셀룰로스 유도체인 셀콰트(CelQuat)(등록상표) SC-230M 또는 H-100(내쇼날 스타치 앤드 케미칼, 인크.(National Starch & Chemical, Inc.)로부터 입수가능)이 이용될 수 있다. 게다가, 알짜 음 전하를 갖는 고분자전해질의 일부 적합한 예는 폴리아크릴산, 예를 들면 폴리(에틸렌-코-메타크릴산, 나트륨염) 등을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 다른 고분자전해질, 예를 들면 양쪽성 고분자전해질(즉, 극성 및 비극성 부분을 가짐) 또한 이용할 수 있음을 알아야 한다. 예를 들면, 적합한 양쪽성 고분자전해질의 예는 폴리(스티릴-b-N-메틸 2-비닐 피리디늄 요오다이드) 및 폴리(스티릴-b-아크릴산)(둘 모두 캐나다 도르발의 폴리머 소스, 인크.(Polymer Source, Inc.)로부터 입수가능)을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다.

[0047] 비록 임의의 고분자전해질이 일반적으로 사용될 수 있지만, 특정 용도에 대하여 선택되는 고분자전해질은 검출 프로브의 성질, 다공성 막 등에 따라 변할 수 있다. 특히, 고분자전해질의 분포된 전하는 이들이 반대 전하를 갖는 물질과 결합하도록 만든다. 따라서, 예를 들면 알짜 양 전하를 갖는 고분자전해질은 종종 음으로 대전된 검출 프로브와 더 잘 결합하도록 되어 있는 반면, 알짜 음 전하를 갖는 고분자전해질은 종종 양으로 대전된 검출 프로브와 더 잘 결합하도록 되어 있다. 따라서, 이러한 경우에, 이들 분자들 사이의 상호작용은 필요한 결합이 보상 대역(35) 내에서 일어날 수 있게 한다. 그럼에도 불구하고, 이온 상호결합이 주로 보상 대역(35)에서 바람직한 결합을 달성하는데 이용되지만, 고분자전해질이 유사한 전하를 갖는 검출 프로브와 결합할 수 있다는 사실도 또한 발견되었다.

[0048] 고분자전해질이 검출 프로브와 결합하도록 설계되었기 때문에, 고분자전해질이 다공성 막(23)의 표면 상에서 실질적으로 비확산적으로 고정화되는 것이 전형적으로 바람직하다. 그렇지 않으면, 검출 프로브는 사용자에게 의해 쉽게 검출가능하지 않게 된다. 따라서, 고분자전해질은 이들이 다공성 막(23)의 매트릭스 내로 실질적으로 확

산되지 않도록 하는 방식으로 다공성 막(23)에 적용될 수 있다. 특히, 고분자전해질은 대표적으로는 이들이 계속 막에 고정화되어 있도록 다공성 막(23)의 표면 상에 존재하는 관능기와 이온 및(또는) 공유 결합을 형성한다. 비록 필수적이진 않지만, 고분자전해질과 다공성 막(23) 사이의 공유 결합 형성은 고분자전해질을 거기에 더 영구적으로 고정화시키는데 바람직할 수 있다.

[0049] 예를 들면, 한 실시태양에서는, 고분자전해질을 형성하는데 사용된 단량체를 먼저 용액으로 한 다음 다공성 막(23)에 직접 적용한다. 다양한 용매(예를 들면, 유기 용매, 물 등)를 이용하여 용액을 형성할 수 있다. 일단 적용되면, 단량체들의 중합이 열, 전자 빔 방사, 유리 라디칼 중합 등을 사용하여 개시된다. 일부 경우, 단량체가 중합됨에 따라, 이들은 다공성 막(23)의 특정 관능기와 공유 결합을 형성하고, 이에 의해 생성되는 고분자전해질을 그 위에 고정화시킨다. 예를 들면, 한 실시태양에서, 에틸렌이민 단량체는 일부 다공성 막(예를 들면, 니트로셀룰로스)의 표면 상에 존재하는 카르복실기와 공유 결합을 형성할 수 있다.

[0050] 다른 실시태양에서는, 고분자전해질이 다공성 막(23)에 적용되기 전에 형성될 수 있다. 경우에 따라, 고분자전해질을 먼저 유기 용매, 물 등을 사용하여 용액으로 만들 수 있다. 그 후, 고분자전해질 용액을 직접 다공성 막(23)에 적용한 다음 건조시킨다. 건조시, 고분자전해질은 고분자전해질과 반대인 전하를 갖는 다공성 막(23)의 표면 상에 존재하는 특정 관능기와 이온 결합을 형성할 수 있다. 예를 들면, 한 실시태양에서, 양으로 대전된 폴리에틸렌이민이 일부 다공성 막(예를 들면, 니트로셀룰로스)의 표면 상에 존재하는 음으로 대전된 카르복실기와 이온 결합을 형성할 수 있다.

[0051] 또한, 고분자전해질은 또한 각종 공지된 기술을 사용하여 다공성 막(23)에 가교결합될 수도 있다. 예를 들면, 일부 실시태양에서는, 에피클로로히드린-관능화 폴리아민 및(또는) 폴리아미도아민이 가교결합가능한 양으로 대전된 고분자전해질로 사용될 수 있다. 이들 물질의 예는 본원에서 모든 목적에 대해 그 전체를 참고문헌으로 인용하고 있는 카임(Keim)의 미국 특허 제3,700,623호, 카임의 미국 특허 제3,772,076호 및 카임의 미국 특허 제4,537,657호에 기재되어 있고, 텔라웨어주 월링톤의 헤르클레스, 인크.(Hercules, Inc.)에 의해 카이멘(Kymene)<sup>TM</sup> 상품명 하에 시판되는 것으로 생각된다. 예를 들면, 카이멘<sup>TM</sup> 450 및 2064는 특정 타입의 다공성 막(예를 들면, 니트로셀룰로스) 상에 존재하는 카르복실기와 공유 결합을 형성하고 경화되었을 때 다공성 막의 중합체 주쇄와 가교결합할 수 있는 4차 암모늄 기 및 에폭시드 고리를 함유하는 에피클로로히드린-관능화 폴리아민 및(또는) 폴리아미도아민 화합물이다. 일부 실시태양에서, 가교결합 온도는 약 10 내지 약 120°C 범위일 수 있고, 가교결합 시간은 약 10 내지 약 600 초 범위일 수 있다.

[0052] 비록 다공성 막(23) 상에 고분자전해질을 비확산적으로 고정화시키기 위한 각종 기술들이 상기되어 있지만, 고분자전해질 화합물을 비-확산적으로 고정화시키기 위한 임의의 다른 기술이 본 발명에 사용될 수 있음을 알아야 한다. 사실상, 상기한 방법들은 본 발명에 사용될 수 있는 기술들을 예시하기 위한 것일 뿐이다. 예를 들면, 일부 실시태양에서, 다공성 막(23)의 매트릭스 내로의 고분자전해질 확산을 실질적으로 억제할 수 있는 특정 성분들이 고분자전해질 용액에 첨가될 수 있다.

[0053] 제2 포획제를 이루는 물질과는 무관하게, 보상 대역(35)는 분석 장치(20)의 분석물질 검출 범위를 개선시킬 수 있다. 이러한 현상은 도 3에 그래프로 예시되어 있다. 나타낸 바와 같이, 검출 대역(31)에서 신호의 세기("I<sub>det</sub>")는 초기에 검출 대역(31)에서 보다 많은 분석물질이 포획됨에 따라 증가한다. 이상적으로는, 측정된 검출 신호 세기는 보다 높은 분석물질 농도에 대하여 계속 직선상으로 증가하게 된다. 그러나, 광학 검출 방법(예를 들면, 형광 및 반사율)은 특히 비교적 높은 검출 프로브 농도에서는, 항상 이러한 이상적인 측정을 제공하지 못한다. 구체적으로, 몇몇 지점에서 검출 대역(31)은 검출 프로브의 추가의 축적을 신호할 수 없게 된다. 그 결과, 검출 대역(31)에서의 신호는 일정하게 되거나 또는 심지어는 감소하게 된다. 예를 들면, 도 3에 나타낸 바와 같이, I<sub>det</sub>는 "A<sub>sat</sub>"의 농도에서는 분석물질 농도가 추가로 증가할 때 일정하게 되기 시작할 수 있다.

[0054] 그러나, 본 발명에 따르면 보상 대역에서의 신호 세기("I<sub>com</sub>")는 검출 대역(31)이 보다 높은 분석물질 농도에 반응할 수 없음을 설명하도록 측정될 수 있다. 분석물질이 존재하지 않을 때, 모든 접합된 검출 프로브가 보상 대역(35)와 결합하게 되기 때문에 I<sub>com</sub>은 그의 최대 세기에 있게 된다. 분석물질 농도가 증가함에 따라, I<sub>com</sub>은 마찬가지로 검출 대역(31)이 보다 많은 수의 분석물질/접합된 프로브 착물을 보유하기 때문에 감소된다. 상기한 검출 및 보상 대역 신호 세기들 사이의 반비례 관계의 결과로, 본 발명자들은 검출 및 보상 대역 모두에서의 신호 세기를 비교함으로써 확장된 범위에 걸쳐 분석물질의 농도가 보다 효율적으로 측정될 수 있음을 발견하였다. 특히, 검출 프로브의 총량은 사전결정된다(예를 들면, 실험적으로). 소정량의 검출 프로브가 존재하기 때문에, 보상 대역(35)에서 포획된 검출 프로브의 양은 검출 대역(31)에서의 검출 프로브의 양에 반비례한다. 따

라서, 보상 대역(35)에서 포획된 검출 프로브의 양은 다량의 검출 프로브가 검출 대역(31)에 포획되어 상기 검출 프로브의 양이 정확하게 측정될 수 없을 때조차도 비교적 정확하게 측정될 수 있다. 예를 들면, 한 실시태양에서, 분석물질의 양은  $I_{det}$  대  $I_{com}$ 의 비에 정비례한다. 검출 및 보상 대역이 속하는 세기 범위에 기초하여, 분석물질에 대한 일반적인 농도 범위가 결정될 수 있다. 경우에 따라,  $I_{det}$  대  $I_{com}$ 의 비를 일정 범위의 공지된 분석물질 농도에 대한 분석물질 농도에 대하여 플롯팅하여 세기 곡선을 생성시킬 수 있다. 미지의 시험 샘플 중의 분석물질의 양을 결정하기 위하여, 신호 비를 이어서 세기 곡선에 따른 분석물질 농도로 전환할 수 있다. 착물화된 및 착물화되지 않은 접합된 검출 프로브의 포획 효율은 임의의 주어진 샘플에 대해 일반적으로 동일하다는 것에 유의해야 한다. 따라서, 포획 효율에 있어서의 변동은 세기의 비(즉,  $I_{det}/I_{com}$ )가 절대 신호 세기 대신에 사용되기 때문에 샘플들 사이에서의 결과를 의미심장하게 방해하지 않는 것으로 여겨진다.

[0055]  $I_{det}$ 와  $I_{com}$  사이의 다른 수학적 관계를 분석물질 농도에 대하여 플롯팅하여 검량 곡선을 생성시킬 수 있음에 또한 유의해야 한다. 예를 들면, 한 실시태양에서는,  $I_{det}/(I_{det}+I_{com})$ 의 값을 분석물질 농도에 대하여 플롯팅하여 세기 곡선을 생성시킬 수 있다.

[0056] 비록 검출 대역(31) 및 보상 대역(35)이 분석물질의 존재를 지시할 수 있다라도, 실제 시험 조건 하에서 시험 샘플 내의 분석물질의 상대 농도를 정확하게 결정하는 것은 종종 어렵다. 따라서, 분석 장치(20)은 또한 검량 대역(32)를 포함할 수도 있다. 본 실시태양에서, 검량 대역(32)는 다공성 막(23) 상에 형성되고, 검출 대역(31) 및 보상 대역(35)로부터 하류에 위치한다. 그러나 다르게는, 검량 대역(32)는 또한 검출 대역(31) 및(또는) 보상 대역(35)로부터 상류에 위치할 수도 있다.

[0057] 검량 대역(32)에는 막(23) 길이를 통과하는 검량 프로브에 결합할 수 있는 제2 포획제가 제공된다. 검량 프로브는 검출 프로브와 동일하거나 또는 상이한 물질로부터 만들어질 수 있고, 상이한 바와 같이 특이적 결합 구성원과 접합될 수 있다. 일반적으로 말하자면, 검량 프로브는 검출 대역(31) 및 보상 대역(35)에서 제1 또는 제2 포획제에 결합하지 않는 방식으로 선택된다. 제3 포획제는 또한 검출 대역(31) 또는 보상 대역(35)에 사용된 포획제와 동일하거나 또는 상이할 수도 있다. 예를 들면, 한 실시태양에서는, 제3 포획제가 생물학적 포획제, 예를 들면 항원, 항체, 단백질 A 또는 G, 뉴트라비딘, 아비딘, 스트렙타비딘, 캡타비딘, 1차 또는 2차 항체 및 이들의 착물이다. 게다가, 검출 대역(31) 및 보상 대역(35)와 유사하게, 검량 대역(32)는 또한 사용자가 시험 샘플 내 특정 분석물질의 농도를 보다 잘 결정할 수 있도록 임의의 방향에서 임의의 수의 독립된 검량 영역들을 제공할 수도 있다.

[0058] 검량 대역(32)는 검출된 분석물질의 정확도를 개선시킬 수 있다. 검량 대역(32)는 또한 상이한 조건 하에서 상이한 시간에 행해진 측정에 대한 별도의 검량의 필요조건을 없앨 수 있다. 검량 프로브의 총량 및 검량 대역(32) 상에서의 제3 포획제의 총량은 사전결정된다. 따라서, 포획된 검량 프로브의 양 및 생성되는 검량 신호는 이상적으로는 변화하는 분석 조건에 기초하여 검출 대역(31)에서 일어나는 것(예를 들면, 온도 변동)과 유사한 방식으로 변동된다. 바람직하게는, 제3 포획제는 검출 대역(31)에서의 제1 포획제의 것과 유사한 분해 프로파일을 갖는다. 검량 프로브는 또한 검출 프로브의 것과 유사한 분해 프로파일을 가질 수 있다. 검출 프로브 및 검량 프로브 모두의 신호 변동은 이상적으로는 변화된 조건과 동일하거나 또는 유사하다.

[0059] 따라서, 검량 대역(32)는 상이한 분석 조건 하에서 검출 대역(31) 및 보상 대역(35)의 세기를 검량하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 도 3을 다시 살펴보면, 분석물질의 양은 검량 세기(" $I_{cal}$ ") 및  $I_{com}$ 의 곱에 대한  $I_{det}$ 의 비(즉,  $I_{det}/(I_{cal})(I_{com})$ )에 정비례할 수 있다. 경우에 따라, 이것은 일정 범위의 공지된 분석물질 농도에 대한 분석물질 농도에 대하여 플롯팅하여 검량 곡선을 생성시킬 수 있다. 미지의 시험 샘플의 양을 결정하기 위하여, 이어서 신호 비는 검량 곡선에 따라 분석물질 농도로 전환될 수 있다. 다른 수학적 관계를 분석물질 농도에 대하여 플롯팅하여 검량 곡선을 생성시킬 수 있음에 또한 유의해야 한다.

[0060] 도 4를 살펴보면, 형광 프로브를 이용하여 분석물질의 존재를 검출하기 위한 방법의 한 실시태양을 이제 보다 상세하게 논의하고자 한다. 초기에, 분석물질 A를 함유하는 시험 샘플을 샘플 패드에 적용시킨다. 샘플 패드로부터 시험 샘플은 분석물질 A가 접합된 형광 검출 프로브(41) 및 형광 검량 프로브(43)(접합될 수도 또는 아닐 수도 있음)와 혼합되는 접합 패드(22)로 "L" 방향으로 이동한다. 비록 형광의 사용이 이러한 특정 실시태양에 이용되지만, 다른 광학적 검출 기술, 예를 들면 인광, 반사율 등이 동등하게 본 발명에 사용하기 적합하다. 예를 들면, 한 실시태양에서는 당 업계에 공지되어 있는 바와 같이, 반사율 분광광도계 또는 판독기가 가시적인 색상을 나타내는 프로브(예를 들면, 착색된 라텍스 미립자)의 존재를 검출하는데 이용될 수 있다. 한 적합한



반사율 판독기가 예를 들면 본원에서 모든 목적에 대해 그 전체를 참고문헌으로 인용하고 있는 케일러(Kaylor) 등의 미국 특허 출원 공개 제2003/0119202호에 기재되어 있다.

[0061] 그림에도 불구하고, 도 4에 예시된 실시태양에서는, 분석물질 A는 집합된 형광 검출 프로브(41)과 결합하여 분석물질/집합된 프로브 착물(49)를 형성한다. 검출 대역(31)에서, 이들 착물(49)은 제1 포획제(90)에 의해 포획된다. 임의의 착물화되지 않은 집합된 형광 검출 프로브(41) 및(또는) 결합되지 않은 분석물질/집합된 프로브 착물(49)는 이어서 이들이 제2 포획제(나타나있지 않음)에 결합되는 보상 대역(35)로 이동한다. 마지막으로, 형광 검량 프로브(43)은 검출 대역(31) 및 보상 대역(35) 모두를 통해 이동하여 검량 대역(32)에서 제3 포획제(나타나있지 않음)와 결합된다.

[0062] 일단 포획되면, 검출 대역(31), 보상 대역(35) 및 검량 대역(32)에서의 프로브들의 형광 신호는 형광 검출을 사용하여 측정될 수 있다. 형광은 특정 형광 화합물에서 일어나는 3단계 방법의 결과이다. 제1 단계에서는, 외부 공급원, 예를 들면 백열전구 또는 레이저에 의해 에너지가 공급되고 형광 화합물에 의해 흡광되어 여기된 전자 단일선 상태를 생성시킨다. 두번째 단계에서는, 형광 화합물이 형태적 변화를 행하고 또한 일정 크기의 그의 분자 환경과의 가능한 상호작용을 받는 한정된 시간 동안 여기된 상태가 존재한다. 이 시간 동안, 여기된 상태의 에너지가 부분적으로 소산되어, 형광 발광이 이로부터 유래되는 이완된 상태를 생성시킨다. 세번째 단계는 에너지가 방출되어, 형광 화합물을 그의 기저 상태로 되돌려 보내는 형광 발광 단계이다. 방출된 에너지는 그의 여기 에너지(빛 또는 레이저)보다 적고, 따라서 더 긴 파장을 갖는다. 이러한 에너지 또는 파장에 있어서의 변위 또는 차이는 방출 에너지가 검출되어 여기 에너지로부터 격리될 수 있게 한다.

[0063] 형광 검출은 일반적으로 여기 광자로부터 방출 광자를 격리시키는 파장 여과 및, 방출 광자를 기록하고 일반적으로 전기 신호 또는 사진 상으로서 판독가능한 출력을 생성시키는 검출기를 이용한다. 일반적으로 4가지 인식된 유형의 검출기, 즉 분광형광계 및 마이크로플레이트 판독기; 형광 현미경; 형광 주사기; 및 흐름 사이토미터가 있다. 본 발명과 함께 사용하기 적합한 한 형광 검출기는 뉴저지주 에디슨의 스펙스 인더스트리이즈, 인크.(SPEX Industries, Inc.)에 의해 시판되는 플루오로로그(FluoroLog) III 스펙트로플루오로미터(Spectrofluorometer)이다.

[0064] 경우에 따라, "시간차 형광 검출(time-resolved fluorescence detection)"로 공지된 기술 또한 본 발명에 이용될 수 있다. 시간차 형광 검출은 특정 형광 물질, 예를 들면 유로퓸(Eu(III)) 및 테르븀(Tb(III))의 란탄족 킬레이트의 형광 특성을 이용함으로써 발광원으로부터의 또는 산란 공정으로부터의(여기 방사선의 산란으로부터 야기) 배경 신호를 감소시키도록 설계된다. 이러한 킬레이트는 실질적으로 더 짧은 파장에서 킬레이트의 여기 후 강하게 적색-변위된, 좁은 밴드의 길게 지속되는 발광을 나타낼 수 있다. 대표적으로는, 킬레이트는 분자에 란탄족에 가깝게 위치한 발색단 때문에 강한 자외선 흡광 밴드를 갖는다. 발색단에 의한 흡광에 이어, 여기 에너지는 여기된 발색단으로부터 란탄족으로 전달될 수 있다. 이것에 이어 란탄족의 특징인 형광 방출이 일어난다. 좁은 밴드 방출 필터와 함께, 펄스된 여기 및 시간-제어(time-gated) 검출의 사용은 대표적으로는 보다 짧게 지속되는 또는 보다 짧은 파장 방출을 갖는 샘플에 존재하는 다른 종으로부터의 방출을 무시하여, 단지 란탄족 킬레이트만으로부터의 형광에 대한 특이적 검출을 가능하게 한다. 형광을 측정하기 위한 다른 시간차 기술은 본원에서 모든 목적에 대해 그 전체를 참고문헌으로 인용하고 있는 데이빗슨(Davidson)의 미국 특허 제 5,585,279호 및 헤밀라(Hemmila) 등의 미국 특허 제5,637,509호에 기재되어 있다.

[0065] 형광을 측정하는데 사용된 기술과는 무관하게, 분석물질의 절대량은 검출 대역(31)에서의 형광 신호를 보상 대역(35)에서의 형광 신호와 및 임의적으로는 검량 대역(32)에서의 형광 신호와 비교함으로써 확인될 수 있다. 예를 들면, 상기한 바와 같이, 분석물질의 양은  $I_{det}/(I_{cal})(I_{com})$ 의 비 및 이 비를 이전에 확인된 검량 곡선을 사용하여 분석물질 농도로 전환시킴으로써 결정될 수 있다.

[0066] 비록 장치 구성형태의 다양한 실시태양들을 위에서 설명하였지만, 본 발명의 장치는 일반적으로 바람직한 임의의 구성형태를 가질 수 있고 상기한 성분들을 모두 포함할 필요는 없음을 알아야 한다. 다양한 다른 장치 구성형태들은 예를 들면 본원에서 모든 목적에 대해 그 전체를 참고문헌으로 인용하고 있는, 람보테(Lambotte) 등의 미국 특허 제5,395,754호; 조우 등의 미국 특허 제5,670,381호; 및 말릭(Malick) 등의 미국 특허 제6,194,220호에 기재되어 있다. 다양한 분석 포맷이 또한 본 발명의 분석 장치를 사용한 분석물질의 존재 또는 부재에 대한 시험에 사용될 수도 있다. 예를 들면, 상기한 실시태양에서, "샌드위치" 포맷이 이용된다. 이러한 샌드위치-타입 분석의 다른 예들은 그림 등의 미국 특허 제4,168,146호 및 톰 등의 미국 특허 제4,366,241호에 의해 기재된다. 또한, 다른 포맷, 예를 들면 "경쟁적" 포맷 또한 이용될 수 있다. 경쟁적 면역학적분석 장치의 예는 본원에서 모든 목적에 대해 그 전체를 참고문헌으로 인용하고 있는, 듀즈 등의 미국 특허 제4,235,601호; 리

오타 등의 미국 특허 제4,442,204호; 및 뷰츨러 등의 미국 특허 제5,208,535호에 기재되어 있다.

[0067] 본 발명자들은 분석 장치 상에서의 보상 대역의 존재가 간단하고 효율적이며 비용-효과적인 방식으로 확장된 농도 범위에 걸쳐 분석물질의 검출을 가능하게 할 수 있다는 것을 발견하였다. 특히, 보상 대역은 없을 경우에 광학 검출 기술의 한계점들로부터 야기될 수 있는 손실 신호들을 보상할 수 있다.

[0068] 본 발명은 하기 실시예를 참고하여 더 잘 이해될 수 있을 것이다.

**실시예**

[0069] **실시예 1**

[0070] 접합된 형광 검출 프로브를 하기 방식으로 제조하였다. 카복실화 라텍스 입자를 0.20 마이크로미터의 입자 크기, 0.5% 고형분 농도를 갖고 370 나노미터의 파장에서 여기되었을 때 615 나노미터의 방출 파장에서 형광을 나타내는 유로퓸 킬레이트로 봉입하였다. 입자는 몰레큘라 프로브즈, 인크.로부터 얻었고 "Eu-P"로 표시하였다.

[0071] 초기에, 500 마이크로리터의 입자를 1 밀리리터의 카르보네이트 완충제로 1회 및 2-[N-포르폴리노]에탄술폰산(MES) 완충제(pH: 6.1, 20 밀리몰)로 2회 원심분리를 사용하여 세척하였다. 세척된 입자들을 250 마이크로리터의 MES 중에 재현탁시켰다. 그 후, 3 밀리그램의 카르보디이미드(폴리사이언스즈, 인크.)를 250 마이크로리터의 MES 중에 용해시키고, 현탁된 입자에 첨가하였다. 혼합물을 진탕기 상에서 실온에서 30분 동안 반응하도록 하였다. 활성화된 입자들을 이어서 보레이트 완충제(폴리사이언스즈, 인크.)로 2회 세척하고 250 마이크로리터의 보레이트 완충제 중에 재현탁시켰다. 이어서 30 마이크로리터의 C-단백질 단일클론 항체((CRP Mab1)(3.4 밀리그램/밀리리터, 바이오스퍼시픽, 인크.(BiosPacific, Inc.)로부터의 A#5811)를 입자 현탁액에 첨가하였다. 혼합물을 전도형 진탕기 상에서 밤동안 실온에서 반응하도록 하였다. 반응 기간 동안, 현탁액을 2회 욱-음파처리하였다. 이어서 입자들을 수집하고 온화한 진탕 하에서 15분 동안 250 마이크로리터의 0.1 몰 에탄올아민(폴리사이언스즈 인크.) 중에서 인큐베이션시켰다. 입자를 헤페스 완충제(N-[2-히드록시에틸]피페라진-N'-(2-에탄술폰산) (20 밀리몰, pH: 7.2)로 2회 세척하였다. 세척된 접합체를 1 밀리리터의 헤페스 완충제 중에 현탁시키고 4°C에서 보관하였다.

[0072] **실시예 2**

[0073] CRP Mab1을 토끼 항 염소 IgG(Cat#41-RG15, 바이오스퍼시픽, 인크. 제품) 또는 염소 항 토끼 IgG(Cat# 41-GR30, 바이오스퍼시픽, 인크. 제품)으로 대체한 것을 제외하고는 실시예 1에 설명한 바와 같이 접합된 형광 검량 프로브를 제조하였다. 접합된 형광 검량 프로브를 각각 "Eu-P41-RG15" 및 "Eu-P41-GR30"로 표시하였다.

[0074] **실시예 3**

[0075] 검출 대역 및 보상 대역이 있는 측방향 흐름 분석 장치를 제조할 수 있는 능력을 입증하였다. 대략 30 cm의 길이를 갖는 니트로셀룰로스 다공성 막(HF 12002, 밀리포어, 인크.(Millipore, Inc.) 제품)을 지지 카드 상에 적층하였다. 골드라인(Goldline)<sup>TM</sup>(폴리리신 용액, 브리티쉬 바이오셀 인터내셔널(British Biocell International)로부터 입수)을 막 상에 스트리핑하여 보상 대역을 형성하였다. 또한, C-반응성 단백질에 대한 단일클론 항체(CRP Mab2)(A#5804, 바이오스퍼시픽, 인크.로부터 입수, 밀리리터 당 1 밀리그램의 농도)를 다공성 막에 고정화시켜 검출 대역을 형성하였다. 이어서 막 샘플을 37°C의 온도에서 1 시간 동안 건조시켰다.

[0076] 접합된 패드를 하기하는 바와 같이 제조하였다. 250 마이크로리터의 실시예 1의 Eu-P CRP 접합된 형광 검출 입자(헤페스 완충제 중에서 밀리리터 당 2.5 밀리그램의 농도)를 375 마이크로리터 트윈(Tween) 20(2%, 알드리히로부터 입수가능) 및 물 중의 375 마이크로리터의 슈크로스(10%)와 혼합하였다. 혼합물을 20분 동안 욱-음파처리하였다. 이어서 현탁액을 15-센티미터 길이의 유리 섬유 접합체 패드(밀리포어 캄파니.) 상에 부하시켰다. 이어서 유리 섬유 패드를 37°C에서 2 시간 동안 건조시켰다.

[0077] 900 마이크로리터의 트윈 20(0.5%)을 15-센티미터 길이의 유리 섬유 샘플 패드(밀리포어 캄파니.) 상에 부하시킨 다음, 그 패드를 37°C에서 2 시간 동안 건조시켜 샘플 패드를 제조하였다. 이어서 셀룰로스 흡상 패드(밀리포어 캄파니.), 샘플 패드 및 접합체 패드를 다공성 막 상에 적층하였다. 적층된 전체 카드를 4-밀리미터 폭의 측방향 흐름 분석 장치로 절단하였다.

[0078] **실시예 4**



[0079] 측방향 흐름 분석 장치를 사용하여 분석물질의 존재를 검출할 수 있는 능력을 입증하였다. 특히, 실시예 3에서 기재한 바와 같이 제조된 11개의 분석 장치를 시험하였다. 55 마이크로리터의 희석된 인간 혈액(100배로 희석함)을 밀리리터 당 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 10, 40, 100, 200, 500, 및 2000 나노그램 범위의 11개의 상이한 CRP 농도로 첨가하고, 별도의 샘플 패드에 적용하였다. 장치는 30분 동안 전개되도록 하였다.

[0080] 검출 대역 및 검량 대역에 대한 형광을 측정하였다. 특히, 분석 완료시, 각 측방향 흐름 장치를 테이프를 사용하여 플루오로로그 III 스펙트로플루오로미터(에스에이 인스트루먼츠, 인크.(SA Instruments, Inc.)로부터 입수 가능)의 샘플 홀더 상에 장착시켰다. 검출 및 보상 대역은 각각 장치의 나머지 부분이 여기 빔으로부터 차단된 채로 유지되는 동안에 여기 빔이 직접 상기 대역 상에 내리쬐 수 있도록 홀더 내의 직사각형 홀 내에 꼭 맞았다. 시간차 형광 기술을 사용하였다. 특히, 하기 실험 파라미터들을 사용하였다: (1) 장치에 수직인 표면에 대한 여기 빔의 각은 70도이었고; 검출 모드는 정면이었고; 슬릿 폭은 5 나노미터이었고; (4) 주사 수는 1이었고; (5) 여기 파장은 370 나노미터이었고; (6) 방출 파장은 615 나노미터에서 수집되었고; (7) 샘플 창은 3 밀리초(ms)이었고; (8) 초기 지연은 0.04 ms이었고; (9) 플래시 당 시간은 50 ms이었고; 및 (10) 플래시의 수는 10이었다.

[0081] 밀리리터 당 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 10, 40, 100, 200, 500, 및 2000 나노그램의 CRP 농도에 대한 검출 대역에서의 세기는 각각 10.4K, 12.4K, 14.7K, 15.8K, 27.0K, 61.7K, 99.1K, 145.8K, 190.4K, 214.5K, 206.0K인 것으로 측정되었다. 밀리리터 당 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 10, 40, 100, 200, 500, 및 2000 나노그램의 CRP 농도에 대한 보상 대역에서의 세기는 각각 280.9K, 216.3K, 165.0K, 187.5K, 170.0K, 123.7K, 65.4K, 56.0K, 8.2K, 3.9K, 2.3K인 것으로 측정되었다. 검출 대역에서의 세기는 초기에는 증가되었지만, 밀리리터 당 약 200 내지 500 나노그램의 CRP 농도에서는 일정하게 되었다. 보상 대역의 세기는 밀리리터 당 2000 나노그램과 같이 높은 CRP 농도에서조차 계속하여 감소되었다. 그러므로, 보상 대역에서의 세기에 대한 검출 대역에서의 세기의 비는 밀리리터 당 약 200 나노그램보다 높은 CRP 농도에서 보다 정확하게 참(true) CRP 농도를 제공하게 된다.

[0082] **실시예 5**

[0083] 검출 대역, 검량 대역 및 보상 대역이 있는 측방향 흐름 분석 장치를 제조할 수 있는 능력을 입증하였다. 대략 30 cm의 길이를 갖는 니트로셀룰로스 다공성 막(HF 12002, 밀리포어, 인크. 제품)을 지지 카드 상에 적층하였다. 골드라인™(폴리리신 용액, 브리티쉬 바이오셀 인터내셔널로부터 입수)을 막 상에 스트리핑하여 보상 대역을 형성하였다. 또한, C-반응성 단백질에 대한 단일클론 항체(CRP Mab2)(A#5804, 바이오스퍼시픽, 인크.로부터 입수, 밀리리터 당 1 밀리그램의 농도)를 다공성 막에 고정화시켜 검출 대역을 형성하였다. 또한, 토끼 항 프로락틴 항체(A#5804, 바이오스퍼시픽, 인크.로부터 입수, 밀리리터 당 1.8 밀리그램의 농도)를 다공성 막 상의 검출 대역과 보상 대역 사이에 고정화시켜 검량 대역을 형성하였다. 이어서 막 샘플을 37°C의 온도에서 1 시간 동안 건조시켰다.

[0084] 250 마이크로리터의 실시예 1의 Eu-P CRP(헤페스 완충제 중에서 밀리리터 당 2.5 밀리그램의 농도) 및 실시예 2의 Eu-P CR30(헤페스 완충제 중에서 밀리리터 당 2.5 밀리그램의 농도)를 300 마이크로리터 트윈 20(2%, 알드리히로부터 입수가능) 및 물 중의 300 마이크로리터의 슈크로스(10%)와 혼합하였다. Eu-P CRP 입자를 검출 프로브로 사용한 반면, Eu-P CR30 입자를 검량 프로브로 사용하였다. 혼합물을 20분 동안 육-음파처리하였다. 이어서 현탁액을 15-센티미터 길이의 유리 섬유 접합체 패드(밀리포어 캄파니.) 상에 부하시켰다. 이어서 유리 섬유 패드를 37°C에서 2 시간 동안 건조시켰다.

[0085] 900 마이크로리터의 트윈 20(0.5%)을 15-센티미터 길이의 유리 섬유 샘플 패드(밀리포어 캄파니.) 상에 부하시킨 다음, 그 패드를 37°C에서 2 시간 동안 건조시켜 샘플 패드를 제조하였다. 이어서 셀룰로스 흡상 패드(밀리포어 캄파니.), 샘플 패드 및 접합체 패드를 다공성 막 상에 적층하였다. 적층된 전체 카드를 4-밀리미터 폭의 측방향 흐름 분석 장치로 절단하였다.

[0086] **실시예 6**

[0087] 측방향 흐름 분석 장치를 사용하여 분석물질의 존재를 검출할 수 있는 능력을 입증하였다. 특히, 실시예 5에서 기재한 바와 같이 제조된 9개의 분석 장치를 시험하였다. 50 마이크로리터의 헤페스 완충액을 밀리리터 당 0, 5, 20, 100, 500, 1000, 2000, 5000 및 10000 나노그램 범위의 9개의 상이한 CRP 농도로 첨가하고, 별도의 샘플 패드에 적용하였다. 장치는 30분 동안 전개되도록 하였다.

[0088] 지연 시간이 0.04 ms인 것을 제외하고는 실시예 4에 기재한 바와 같이 시간-제어 형광 세기를 측정하였다. 밀리리터 당 0, 5, 20, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 및 10000 나노그램의 CRP 농도에 대한 검출 대역에서의 세

기는 각각 26.7K, 39.0K, 47.0K, 109K, 159K, 186K, 217K, 219K, 193K인 것으로 측정되었다. 밀리리터 당 0, 5, 20, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 및 10000 나노그램의 CRP 농도에 대한 검량 대역에서의 세기는 각각 96.6K, 136K, 101 K, 119K, 103K, 88.7K, 86.8K, 88.1K, 87.9K인 것으로 측정되었다. 밀리리터 당 0, 5, 20, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 및 10000 나노그램의 CRP 농도에 대한 보상 대역에서의 세기는 각각 123K, 146K, 93.6K, 158K, 131K, 81.8K, 69.3K, 54.1K, 34.0K인 것으로 측정되었다. 나타낸 바와 같이, 검출 대역에서의 세기는 초기에는 증가되었지만, 밀리리터 당 약 2000 나노그램의 CRP 농도에서는 일정하게 된 반면, 보상 대역의 세기는 초기에 일정하게 유지되어, 밀리리터 당 1000 나노그램의 CRP 농도에서 감소되기 시작하기 전까지는 일정하게 유지되었다. 그러므로, 검량 대역에서의 세기에 의해 검량하였을 때 보상 대역에서의 세기에 대한 검출 대역에서의 세기의 비는 밀리리터 당 약 200 나노그램 이상의 CRP 농도에 대하여 보다 정확하게 참 CRP 농도를 제공하게 된다.

[0089]

**실시예 7**

[0090]

검출 대역, 검량 대역 및 보상 대역이 있는 절반 측방향 흐름 분석 장치를 제조할 수 있는 능력을 입증하였다. 대략 30 cm의 길이를 갖는 니트로셀룰로스 다공성 막(HF 12002, 밀리포어, 인크. 제품)을 지지 카드 상에 적층하였다. 골드라인™(폴리리신 용액, 브리티쉬 바이오셀 인터내셔널로부터 입수)을 막 상에 스트리핑하여 보상 대역을 형성하였다. 또한, C-반응성 단백질에 대한 단일클론 항체(CRP Mab2)(A#5804, 바이오스퍼시픽, 인크.로부터 입수, 밀리리터 당 1 밀리그램의 농도)를 다공성 막에 고정화시켜 검출 대역을 형성하였다. 또한, 토끼 항 프로락틴 항체(A#5804, 바이오스퍼시픽, 인크.로부터 입수, 밀리리터 당 1.8 밀리그램의 농도)를 다공성 막 상의 검출 대역과 보상 대역 사이에 고정화시켜 검량 대역을 형성하였다. 이어서 막 샘플을 37°C의 온도에서 1 시간 동안 건조시켰다.

[0091]

80 마이크로리터의 염소 항-토끼 IgG와 접합된 금 입자(10 나노미터 입자 크기, 시그마(Sigma) 제품)("검량 프로브") 및 50 마이크로리터의 CRP Mab1과 접합된 금 입자(40 나노미터 입자 크기, 브리티쉬 바이오셀 인터내셔널 제품)("검출 프로브")를 280 마이크로리터의 물 및 물 중의 200 마이크로리터의 슈크로스(10%)와 혼합하였다. 이어서 현탁액을 10-센티미터 길이의 유리 섬유 접합체 패드(밀리포어 캄파니.) 상에 부하시켰다. 이어서 유리 섬유 패드를 37°C에서 2 시간 동안 건조시켰다. 300 마이크로리터의 트윈 20(0.5%) 및 1200 마이크로리터의 물을 10-센티미터 길이의 셀룰로스 패드(밀리포어 캄파니.) 상에 부하시킨 다음, 그 패드를 37°C에서 2 시간 동안 건조시켜 샘플 패드를 제조하였다. 이어서 셀룰로스 흡상 패드(밀리포어 캄파니.), 샘플 패드 및 접합체 패드를 다공성 막 상에 적층하였다. 적층된 전체 카드를 4-밀리미터 폭의 측방향 흐름 분석 장치를 절단하였다.

[0092]

**실시예 8**

[0093]

측방향 흐름 분석 장치를 사용하여 분석물질의 존재를 검출할 수 있는 능력을 입증하였다. 특히, 실시예 7에서 기재한 바와 같이 제조된 10개의 분석 장치를 시험하였다. 60 마이크로리터의 헤페스 완충액을 밀리리터 당 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 및 2000 나노그램 범위의 10개의 상이한 CRP 농도로 첨가하고, 별도의 샘플 패드에 적용하였다. 장치는 30분 동안 전개되도록 하였다.

[0094]

반사율 판독기를 사용하여 반사율 세기를 측정하였다. 밀리리터 당 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 및 2000 나노그램의 CRP 농도에 대한 검출 대역에서의 반사율 세기는 각각 0, 0, 0, 0.0498, 0.0806, 0.4433, 1.418, 2.347, 2.407, 및 2.402인 것으로 측정되었다. 밀리리터 당 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 및 2000 나노그램의 CRP 농도에 대한 검량 대역에서의 반사율 세기는 각각 1.072, 0.9650, 0.9752, 1.010, 0.9993, 0.8954, 1.030, 1.020, 1.035, 및 1.070인 것으로 측정되었다. 밀리리터 당 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 및 2000 나노그램의 CRP 농도에 대한 보상 대역에서의 세기는 각각 1.414, 1.167, 1.345, 1.312, 1.045, 1.241, 1.331, 0.843, 0.6169, 및 0.4608인 것으로 측정되었다. 나타낸 바와 같이, 검출 대역에서의 반사율 세기는 초기에 증가된 다음, 밀리리터 당 약 500 나노그램의 CRP 농도에서는 일정하게 된 반면, 보상 대역의 세기는 초기에 밀리리터 당 200 나노그램의 CRP 농도에서 감소되기 시작하기 전까지는 비교적 일정하게 유지되었다. 검량 대역에서의 세기는 비교적 일정하게 유지되었다. 그러므로, 검량 대역에서의 세기에 의해 검량하였을 때 보상 대역에서의 세기에 대한 검출 대역에서의 반사율 세기의 비는 밀리리터 당 500 나노그램 이상의 CRP 농도에 대하여 보다 정확하게 참 CRP 농도를 제공하게 된다.

[0095]

본 발명을 그의 구체적인 실시태양에 관하여 상세하게 설명하였지만, 당 업계의 통상의 숙련인은 상기한 내용을 이해할 때 이들 실시태양들에 대한 변경, 변화 및 등가물을 쉽게 생각해 낼 수 있을 것임을 알 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 범위는 첨부된 특허 청구의 범위 및 이들에 대한 임의의 등가물의 것으로서 평가되어야

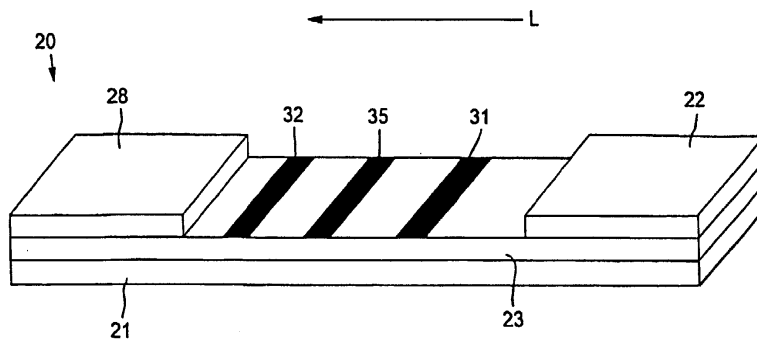
한다.

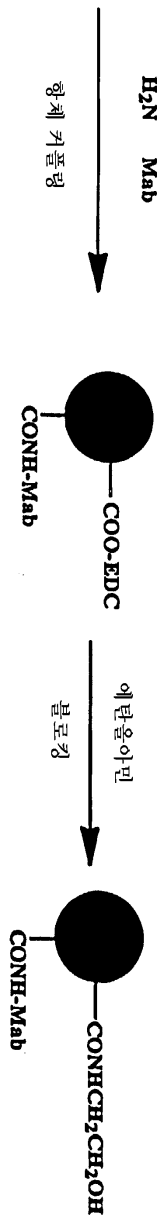
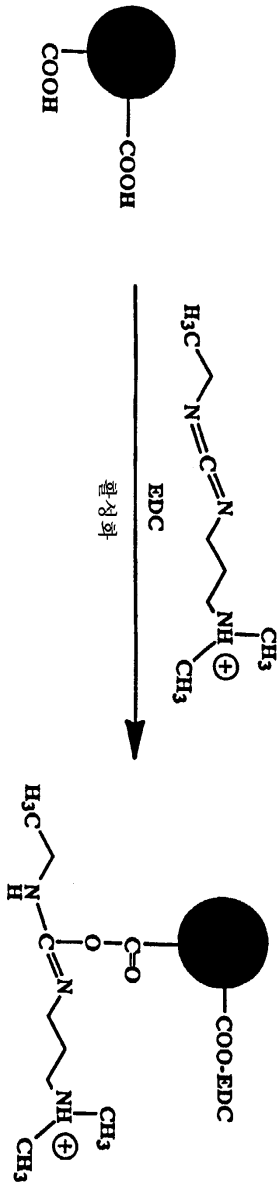
**도면의 간단한 설명**

- [0019] 당 업계의 통상의 숙련인을 위한, 최상의 방식을 비롯한 본 발명의 전체적인 및 가능한 내용들이 첨부된 도면을 참고로 하는 본 명세서의 나머지 부분에서 보다 구체적으로 기재된다.
- [0020] 도 1은 본 발명의 관통홀름 분석 장치의 한 실시태양의 투시도이다.
- [0021] 도 2는 항체를 검출 프로브에 공유적으로 접합시키기 위한 한 실시태양을 예시한 그래프이다.
- [0022] 도 3은 본 발명의 한 실시태양에 따라 검출 및 보상 대역에 대한 신호 세기와 분석물질 농도 사이의 관계를 예시한 그래프이다.
- [0023] 도 4는 본 발명의 샌드위치 분석 포맷의 한 실시태양에 사용된 기전을 예시한 그래프이다.
- [0024] 본 명세서 및 도면에서 도면 부호의 반복된 사용은 본 발명의 동일하거나 또는 유사한 특징 또는 엘리먼트들을 나타내기 위한 것이다.

**도면**

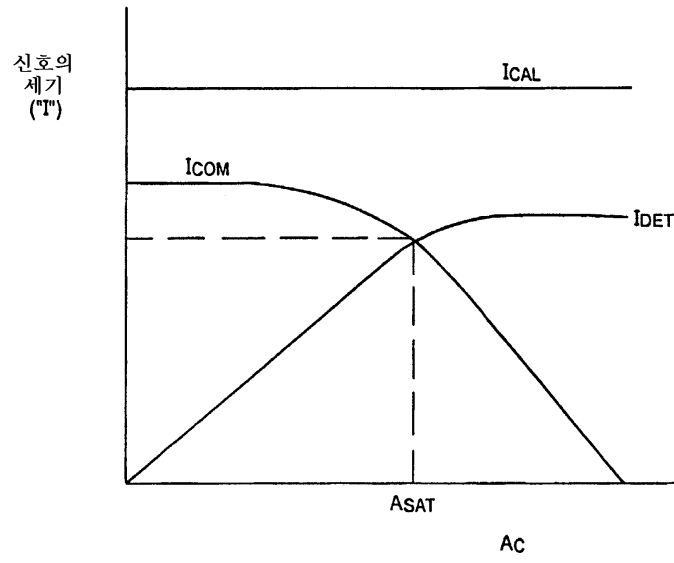
**도면1**





도면2

도면3



도면4

