



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I691716 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：104126255

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 08 月 12 日

(51)Int. Cl. : **G01N21/552 (2014.01)****G01N33/48 (2006.01)**

(30)優先權：2014/08/13 美國

62/037,071

2014/11/20 美國

62/082,468

(71)申請人：美商艾巴希斯公司 (美國) ABAXIS INC. (US)

美國

(72)發明人：梅拉 拉傑許 MEHRA, RAJESH K. (US) ; 蔣 文森 CHIANG, VINCENT (US) ;

艾隆 肯尼士 ARON, KENNETH P. (US) ; 柯瑞爾 艾敘爾 KRELL, ASHER (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

TW 201408690A

US 2010/0062545A1

US 2010/0120057A1

審查人員：陳勇志

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：7 共 51 頁

(54)名稱

電漿特異性結合搭配物檢定中之信號放大

(57)摘要

本發明涉及分析物偵測裝置及使用此等裝置來偵測樣本中之極少量目標分析物之方法。詳言之，本發明提供分析物偵測裝置，其包括共軛至分析物結合搭配物之複數個複合金屬奈米結構及含有複數個捕獲分子固定於其上之金屬奈米層之表面。亦描述製備複合奈米結構之方法。

The present invention relates to analyte detection devices and methods of using such devices to detect minute quantities of a target analyte in a sample. In particular, the invention provides an analyte detection device comprising a plurality of composite metallic nanostructures conjugated to analyte binding partners and a surface containing a metallic nanolayer on which a plurality of capture molecules is immobilized. Methods of preparing composite nanostructures are also described.

指定代表圖：

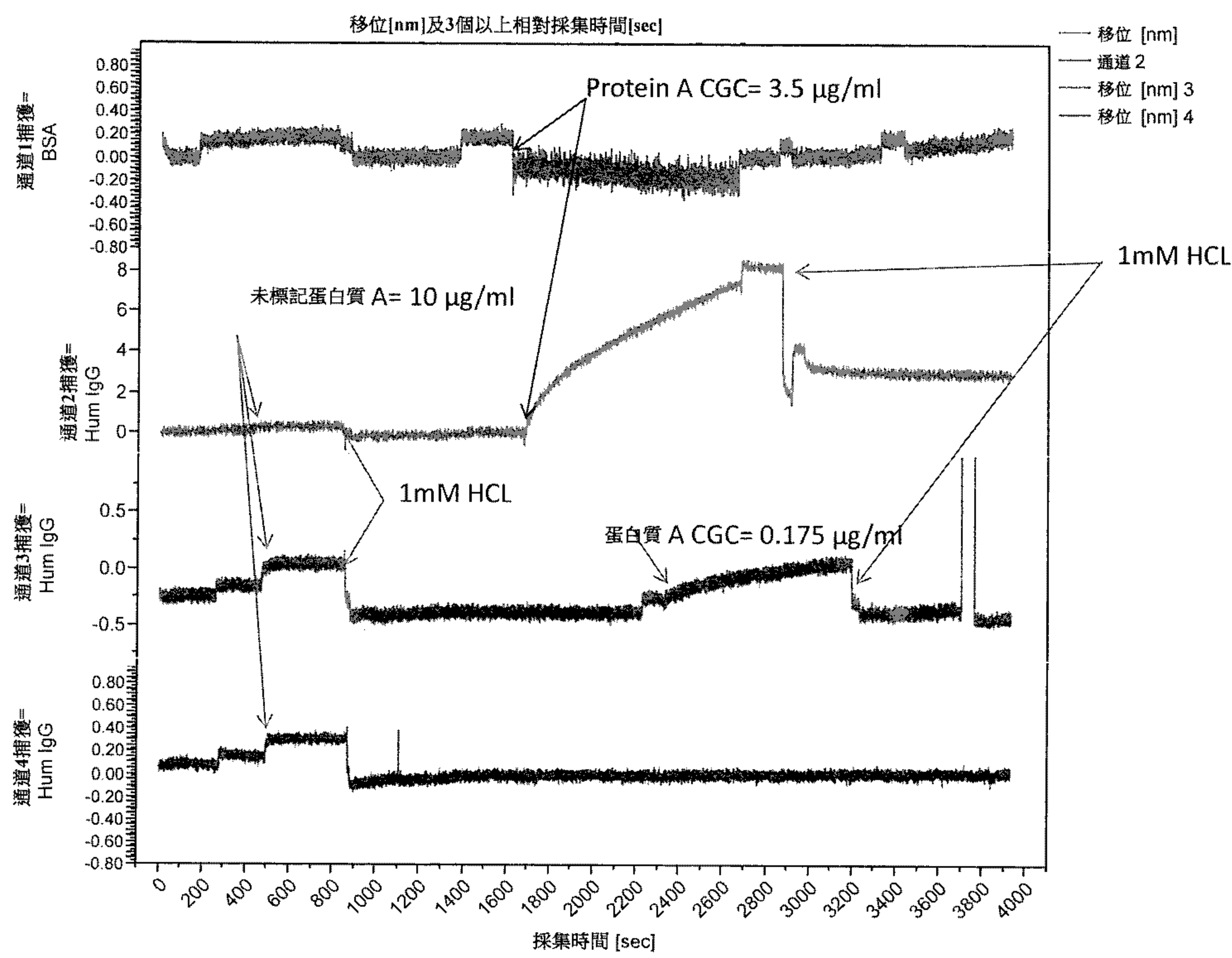


圖 1

I691716

發明摘要

※申請案號：104126255

※申請日：104 年 08 月 12 日

※IPC 分類： **G01N 21/552** (2014.01)**G01N 33/48** (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

電漿特異性結合搭配物檢定中之信號放大

Signal amplification in plasmonic specific-binding partner assays

【中文】

本發明涉及分析物偵測裝置及使用此等裝置來偵測樣本中之極少量目標分析物之方法。詳言之，本發明提供分析物偵測裝置，其包括共軛至分析物結合搭配物之複數個複合金屬奈米結構及含有複數個捕獲分子固定於其上之金屬奈米層之表面。亦描述製備複合奈米結構之方法。

【英文】

The present invention relates to analyte detection devices and methods of using such devices to detect minute quantities of a target analyte in a sample. In particular, the invention provides an analyte detection device comprising a plurality of composite metallic nanostructures conjugated to analyte binding partners and a surface containing a metallic nanolayer on which a plurality of capture molecules is immobilized. Methods of preparing composite nanostructures are also described.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：
無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

電漿特異性結合搭配物檢定中之信號放大

Signal amplification in plasmonic specific-binding partner assays

[相關申請案之交互參照]

[0001] 本申請案主張 2014 年 8 月 13 日申請之美國臨時申請案第 62/037,071 號及 2014 年 11 月 20 日申請之美國臨時申請案第 62/082,468 號之優先權，該等申請案各自以全文引用之方式併入本文中。

【技術領域】

[0002] 本發明係關於偵測樣本中之目標分析物之系統及方法。詳言之，本發明提供基於局部電漿共振之分析物偵測系統，其能夠偵測樣本中之極少量目標分析物。

【先前技術】

[0003] 當前免疫檢定及生物分子結合檢定通常需要多個步驟及複雜設備來執行檢定。在執行此等異質檢定中所涉及的靈敏度之缺乏及複雜性由將標記與未標記特異性結合搭配物分離之特定需要產生。

[0004] 已經嘗試開發基於貴金屬奈米顆粒之局部表面電漿共振(LSPR)性質之檢定(Tokel 等人, Chem Rev., 第

114 卷：5728-5752, 2014)。LSPR 係藉由入射光誘導之奈米大小結構中之電子之共同振盪。金屬奈米顆粒對於其最近處之折射係數變化具有強電磁反應，因此奈米顆粒之共振頻率之偏移可作為結合至奈米顆粒表面之分子之指示來量測。雖然金屬奈米顆粒，尤其金奈米顆粒，在診斷檢定中用於偵測結合事件，此等檢定總體上受到低靈敏度之影響並且不能用於定量地監測連續結合事件之動力學。

[0005] 因此，需要在提供增加之靈敏度的同時使用均質格式之改良檢定方法。利用標準實驗室技術諸如光譜學之檢定將亦為合乎需要的。

【發明內容】

[0006] 本發明部分地基於以下發現：複合金屬奈米結構可增強藉由分子結合至金屬奈米層表面所誘導的光學信號。所觀察到的放大極大地增加偵測特異性生物分子結合事件之靈敏度以使得可偵測亞皮克數量之生物分子。因此，本發明提供分析物偵測裝置及使用此等裝置來偵測樣本中之極少量目標分析物之方法。

[0007] 在一實施例中，分析物偵測裝置包括複數個偵測共軛物、含有金屬奈米層之表面，及複數個捕獲分子，其中捕獲分子固定於金屬奈米層上並且能夠特異性結合至目標分析物。在分析物偵測裝置以夾心檢定格式來組配的實施例中，偵測共軛物包含偶合至能夠特異性結合至目標分析物之結合搭配物的複合金屬奈米結構。在分析物

偵測裝置以直接競爭檢定格式來組配之實施例中，偵測共軛物包含偶合至目標分析物之複合金屬奈米結構。

[0008] 偵測共軛物中之複合金屬奈米結構總體上包含至少兩種貴金屬、過渡金屬、鹼金屬、鑼系元素或其組合。在一些實施例中，複合金屬奈米結構包含至少兩種選自金、銀、銅、鉑、鈮、鎳、鐵、鎳及鋅之金屬。在某些實施例中，複合金屬奈米結構中之每一者包括第一金屬之核心及第二金屬之塗層。在一些實施例中，核心可為鍍金之銀或銅。在其他實施例中，第一金屬之核心可在塗佈之後溶解以使得產生由第二塗層金屬組成之空心結構。

[0009] 沉積於表面上之金屬奈米層可為金屬薄膜或由固定於表面上之複數個金屬奈米結構組成。金屬奈米層亦可由貴或過渡金屬組成。在一些實施例中，金屬奈米層包含金、銀、銅、鉑、鈮、鎳、鋅或其複合物。在一實施例中，金屬奈米層包含金。在另一實施例中，金屬奈米層包含銀。在仍然另一實施例中，金屬奈米層包含用金奈米層覆蓋在其上之銀奈米層。

[0010] 本發明亦提供使用本文所述之分析物偵測裝置來偵測樣本中之目標分析物之方法。在一實施例中，該等方法包括將樣本與複數個偵測共軛物混合，將混合物與含有複數個捕獲分子固定於其上之金屬奈米層之表面接觸，將表面暴露於紫外線-可見-紅外線光譜內之波長範圍下之光源；並且量測來自表面之光學信號，其中光學信號之變化指示樣本中之目標分析物之存在。在某些實施例

中，本發明之方法能夠偵測樣本中之毫微微克至奈克數量之目標分析物。

[0011] 本發明包括檢定複合物，其包含：包括偶合至結合搭配物之複合金屬奈米結構之偵測共軛物；目標分析物；及捕獲分子固定於其上之金屬奈米層塗佈顆粒，其中偵測共軛物中之結合搭配物結合至目標分析物上之第一抗原決定基並且捕獲分子結合至目標分析物上之第二抗原決定基，從而形成包括偵測共軛物、目標分析物及捕獲分子之複合物。在一些實施例中，複合金屬奈米結構為鍍金之銀奈米結構或鍍金之銅奈米結構並且顆粒上之金屬奈米層塗層包含金。

[0012] 在另一態樣中，本發明提供製備用於本文描述之偵測裝置及方法之複合金屬奈米結構之方法。在一實施例中，該等方法包括製備包括聚合物與氯金酸之混合物之第一溶液，製備包括銀或銅奈米結構之第二溶液，並且將第一溶液與第二溶液孵育一段時間，其中所得混合物包含鍍金之銀奈米結構或鍍金之銅奈米結構。在某些實施例中，將還原劑，如抗壞血酸，添加至反應混合物以增加所產生的奈米結構之數量。在一實施例中，第一溶液中之聚合物為聚乙烯吡咯啉酮。在另一實施例中，第一溶液中之聚合物為聚乙醇。

【圖式簡單說明】

[0013] 圖 1. 牛血清白蛋白(BSA)偶合金奈米層感測

器(通道 1)及人 IgG 偶合金奈米層感測器(通道 2-4)之峰波長之移位相較於採集時間之繪圖。箭頭指示未標記蛋白質 A、1 mM HCl，或用膠體金(CGC)標記之蛋白質 A 之注射序列及濃度。

[0014] 圖 2. 抗-CRP C7 抗體偶合金奈米層感測器之峰波長之移位相較於採集時間之繪圖。箭頭指示不同通道中之 0 至 100 ng/ml 濃度之 CRP(CRP 負荷)，1 μ g/ml 未標記抗-CRP C6 抗體，或 3 μ g/ml 用膠體金(C6-CGC)標記之抗-CRP C6 抗體之注射序列。當感測器表面以未標記抗-CRP C6 抗體佔據時，未觀察到進一步 C6-CGC 結合。

[0015] 圖 3. 抗-CRP C7 抗體偶合金奈米層感測器之峰波長之移位相較於採集時間之繪圖。箭頭指示不同通道中之 0 至 100 ng/ml 濃度之 CRP(CRP 負荷)，1 μ g/ml 用膠體金標記之抗-CRP C6 抗體(C6-CGC)，3 μ g/ml C6-CGC，或 1 mM HCl(酸)之注射序列。

[0016] 圖 4A. 以圖 3 之不同 C6-CGC 濃度之 10 ng/ml CRP 負載之抗-CRP C7 抗體偶合金奈米層感測器之反射譜。

[0017] 圖 4B. 引入用膠體金標記之 3 μ g/ml 抗-CRP C6 抗體(C6-CGC)之後，與三種濃度之 CRP 中之一者一起孵育之抗-CRP C7 抗體偶合金奈米層感測器之峰波長之移位相較於採集時間之繪圖。右側之表描繪引入 C6-CGC 之後 700 秒之峰分析。

[0018] 圖 5. 抗-CRP C7 抗體偶合金奈米層感測器之

峰波長之移位相較於採集時間之繪圖。箭頭指示不同通道中之 0 至 100 ng/ml 濃度之 CRP(CRP 負荷具有最小化之孵育時間)，3 $\mu\text{g/ml}$ 用膠體金標記之抗-CRP C6 抗體(C6-CGC)，或 1 mM HCl(酸)之注射序列。

[0019] 圖 6. 即時引入 3 $\mu\text{g/ml}$ 用膠體金標記之抗-CRP C6 抗體(C6-CGC)之後，圖 5 之痕量之峰波長之移位相較於採集時間之繪圖。右側之表描繪如與藉由 CRP 孵育獲得之峰移位(值展示於圖 4B 中)相比，引入 C6-CGC 之後 700 秒之峰分析。

[0020] 圖 7. 與三種濃度之 CRP 中之一者及共軛至鍍金之銀奈米結構之 C6 抗-CRP 抗體一起孵育的抗-CRP C7 抗體偶合金奈米層感測器之峰波長之移位相較於採集時間之繪圖。對照為具有固定之牛血清白蛋白(BSA)代替 C7 抗體之金奈米層感測器。

【實施方式】

[0021] 本發明部分地基於以下發現：基於 LSPR 之檢定中之顯著放大可藉由以複合金屬奈米結構標記之結合搭配物來達成。因此，本發明提供包括 LSPR 表面之分析物偵測裝置，例如，含有金屬奈米層之表面、固定至金屬奈米層之複數個捕獲分子，及包括偶合至生物分子之複合金屬奈米結構之複數個偵測共軛物。

[0022] 分析物偵測裝置可以夾心檢定格式或直接競爭檢定格式來組配。例如，在一實施例中，夾心檢定格式

之分析物偵測裝置包含(i)複數個偵測共軛物，其中共軛物包括偶合至能夠特異性結合至目標分析物之結合搭配物的複合金屬奈米結構，(ii)含有金屬奈米層之表面，及(iii)複數個捕獲分子，其中捕獲分子固定於金屬奈米層上並且能夠特異性結合至目標分析物。在另一實施例中，直接競爭性檢定格式之分析物偵測裝置包含(i)複數個偵測共軛物，其中共軛物包括偶合至目標分析物之複合金屬奈米結構，(ii)含有金屬奈米層之表面，及(iii)複數個捕獲分子，其中捕獲分子固定於金屬奈米層上並且能夠特異性結合至目標分析物。

[0023] 本發明之分析物偵測裝置包括含有金屬奈米層之表面。表面可為任何合適尺寸及形狀，如晶片、孔、光析管或顆粒。在一些實施例中，表面為長方形晶片。在其他實施例中，表面為圓盤。在某些實施例中，表面為光析管(例如，圓柱形或長方形光析管)之底部、蓋子及/或內壁。在其他實施例中，表面為非金屬顆粒之陣列。表面可由各種材料包括但不限於玻璃、石英、矽、二氧化矽、聚苯乙烯、石墨、織物(例如聚乙烯織物)、絲網或膜(例如膠乳、聚乙烯化合物、耐綸或聚酯膜)來製造。

[0024] 金屬奈米層較佳沉積於表面上。在一些實施例中，金屬奈米層可覆蓋具體表面之整個表面區域。在其他實施例中，金屬奈米層可僅沉積於表面之一部分上。舉例而言，表面可含有複數個凹陷或孔並且金屬奈米層沉積於凹陷或孔內。在其他實施例中，金屬奈米層可以橫過表

面之複數個間隔沉積物形式施加至表面。金屬奈米層之光學性質可藉由改變奈米層之厚度及/或奈米結構之性質來調節。在一實施例中，奈米層由金屬奈米島組成。在另一實施例中，奈米層由奈米棒組成。用於本發明裝置及方法中之金屬奈米層之合適厚度包括約 0.5 nm 至約 100 nm，約 5 nm 至約 30 nm，或約 3 nm 至約 10 nm。具有可用於本發明裝置及方法中之金屬奈米層塗層之示例性表面包括在美國專利公開案第 2006/0240573 號中所描述之表面，其全部以引用方式併入本文。

[0025] 在某些實施例中，金屬奈米層為金屬薄膜。將金屬薄膜沉積於基板表面上之方法為熟習此項技術者已知並且包括但不限於，原子層沉積、脈衝雷射沉積、落模鑄造、氣相沉積及吸附。參見，例如，Atanasov 等人，*Journal of Physics: Conference Series* 514 (2014); Walters 及 Parkin, *Journal of Materials Chemistry*, 19: 574-590, 2009; 以及 Gupta 等人，*J. Appl. Phys.* 92, 5264-5271, 2002，其中之每一者全部以引用的方式併入本文。金屬薄膜可包括其他組分，例如金屬薄膜可為聚合物薄膜、Langmuir-Blodgett 薄膜或氧化物薄膜。在一些實施例中，金屬薄膜包含兩個層，其中每個層包含不同金屬。舉例而言，金屬薄膜可包括用金屬覆蓋在其上之銀層。

[0026] 在其他實施例中，金屬奈米層包含固定至表面之複數個金屬奈米結構。金屬奈米結構可固定至表面，該固定藉由用試劑處理表面材料以添加官能化學基團，如

強度。因此，在一些實施例中，金屬奈米層(金屬薄膜或複數個金屬奈米結構)可主要由一或多種鹼金屬或鏷系元素組成。在其他實施例中，金屬奈米層(金屬薄膜或複數個金屬奈米結構)可主要由貴金屬及鹼金屬或鏷系元素之組合組成。

[0028] 本發明之分析物偵測裝置進一步包括固定至沉積於表面上之金屬奈米層之複數個捕獲分子。捕獲分子能夠特異性結合至目標分析物。如本文使用，「特異性結合」係關於以較高親和力結合至目標分子，例如，至少 10^{-6}M 之親和力。在一些實施例中，捕獲分子為半抗原及其他小分子，藥物，激素，生物大分子包括但不限於，抗體或其片段(例如，Fv、Fab、 $(\text{Fab})_2$ 、單鏈、CDR 等)，抗原，受體，配體，多核苷酸，適體，多肽，多醣，脂多醣，醣肽，脂蛋白，或核蛋白。在某些實施例中，複數個捕獲分子為抗體。在其他實施例中，複數個捕獲分子為抗原。

[0029] 將分子固定至金屬奈米層或奈米結構之方法為熟習此項技術者已知。此等方法包括共軛化學，如涉及 1-乙基-3-[3-二甲胺基丙基]碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)、磺基-NHS 偶合、疏水性結合或硫醚化學之彼等。在一些實施例中，分子可經由較大載體分子或蛋白質來間接地偶合至金屬奈米層或奈米結構。當分子較小時，如激素、藥物及小於 10 kD 之其他小分子，此間接偶合尤其適用。較佳地，載體蛋白質不能夠與目標分析物特異性相互作用。

[0030] 本發明之分析物偵測裝置亦可包括複數個偵測共軛物。取決於檢定組配，偵測共軛物包括偶合至能夠特異性結合至目標分析物或捕獲分子之結合搭配物的金屬奈米結構。舉例而言，在裝置以夾心檢定格式組配之實施例中，偵測共軛物包括偶合或共軛至能夠特異性結合目標分析物之結合搭配物的金屬奈米結構。在裝置以直接競爭檢定格式組配之其他實施例中，偵測共軛物包括偶合或共軛至目標分析物之金屬奈米結構。

[0031] 結合搭配物可為與捕獲分子相同類型之分子，包括但不限於半抗原及其他小分子，藥物，激素，生物大分子如抗體或其片段(例如，Fv、Fab、(Fab)₂、單鏈、CDR等)，抗原，受體，配體，多核苷酸，適體，多肽，多醣，脂多醣，醣肽，脂蛋白，或核蛋白。在一些實施例中，結合搭配物為與捕獲分子相同類型之分子，但是較佳在不同於捕獲分子之結合部位之位置處結合至目標分析物。舉例而言，結合搭配物及捕獲分子可均為識別目標分析物之抗體，但是結合搭配物結合目標分析物之抗原決定基與捕獲分子結合目標分析物之抗原決定基分開並且理想地不重疊。因此，在某些實施例中，結合搭配物為識別目標分析物之第一抗原決定基之抗體並且捕獲分子為識別目標分析物之第二抗原決定基之不同抗體。

[0032] 偵測共軛物中之金屬奈米結構可主要由貴金屬或其複合物組成。在一些實施例中，偵測共軛物中之金屬奈米結構可主要由過渡金屬或其複合物組成。在一些實

施例中，偵測共軛物中之金屬奈米結構可包括鹼金屬或鑼系元素以及貴或過渡金屬。在某些實施例中，偵測共軛物中之金屬奈米結構包括選自金、銀、銅、鉑、鈀、鈳、銦、銑、鈦、鉻、鎳、鋅、鐵、鈷、鎳及其複合物之金屬。在一實施例中，金屬奈米結構為金奈米結構。在另一實施例中，金屬奈米結構為銀奈米結構。

[0033] 在較佳實施例中，偵測共軛物中之金屬奈米結構為複合金屬奈米結構。「複合金屬奈米結構」係關於包括至少兩種貴金屬、過渡金屬、鹼金屬或鑼系元素之奈米結構。兩種或兩種以上金屬可混合在一起，如在合金中，或兩種或兩種以上金屬可存在於奈米結構之單獨部分中。舉例而言，一種金屬可形成奈米結構之核心，而第二金屬形成奈米結構之外殼層或塗層。在一些實施例中，複合金屬奈米結構包括至少兩種選自金、銀、銅、鉑、鈀、鈳、銦、銑、鈦、鉻、鎳、鋅、鐵、鈷及鎳之金屬。在其他實施例中，複合金屬奈米結構包括至少兩種選自金、銀、銅、鉑、鈀、鎳、鐵、鎳及鋅之金屬。在一特定實施例中，複合金屬奈米結構包括金及銀。在另一實施例中，複合金屬奈米結構包括金及銅。在另一實施例中，複合金屬奈米結構包括銀及銅。

[0034] 在一些實施例中，複合金屬奈米結構中之每一者為第一金屬與第二金屬之合金。在某些實施例中，複合金屬奈米結構中之每一者包含第一金屬之核心及第二金屬之塗層。在一實施例中，核心為銀並且塗層為金。在另

一實施例中，核心為銅並且塗層為金。在另一實施例中，核心為銀並且塗層為銅。在一些實施例中，複合金屬奈米結構中之每一者包含電介質核心(例如二氧化矽、硫化金、二氧化鈦、二氧化矽及聚苯乙烯)，第一金屬之第一塗層，及第二金屬之第二塗層。在一特定實施例中，核心為二氧化矽，第一塗層(即內塗層)為鍍銀層，並且第二塗層為鍍金層(即外塗層)。在另一實施例中，核心為二氧化矽，第一塗層(即內塗層)為銅塗層，並且第二塗層為鍍金層(即外塗層)。

[0035] 在一些實施例中，在使用第二金屬之塗佈過程之後，將包含第一金屬之核心溶解以產生由第二金屬組成之空心結構。例如，銀核心用金奈米顆粒塗佈產生銀核心周圍之金外殼並且銀核心隨後溶解或降解，導致形成中空奈米金殼層結構。

[0036] 金屬奈米結構包括球狀奈米顆粒以及奈米片及奈米殼。奈米片具有大於其厚度之橫向尺寸(例如邊緣長度)。奈米片包括奈米盤、奈米多邊形、奈米六邊形、奈米立方塊、奈米環、奈米星及奈米棱柱體。在一些實施例中，金屬奈米結構，包括複合奈米結構，具有選自以下之幾何結構；球狀奈米顆粒、錐體奈米顆粒、六邊形奈米顆粒、納米管、奈米殼、奈米棒、奈米點、奈米島、奈米線、奈米盤、奈米立方塊或其組合。其他形狀亦為可能的，包括不規則形狀。在某些實施例中，金屬奈米結構之尺寸及形狀為不均勻的-即金屬奈米結構為不同形狀及尺

寸之奈米結構之非均勻混合物。

[0037] 對於球狀奈米顆粒，合適直徑範圍包括約 5 nm 至約 200 nm，約 10 nm 至約 100 nm，及約 20 nm 至約 60 nm。對於奈米片，邊緣長度可為約 10 nm 至約 800 nm，約 20 nm 至約 500 nm，約 50 nm 至約 200 nm，約 30 nm 至約 100 nm，或約 10 nm 至約 300 nm。奈米片之厚度可在約 1 至約 100 nm，約 5 nm 至約 80 nm，約 10 nm 至約 50 nm，或約 5 nm 至約 20 nm 之範圍內。

[0038] 在一些實施例中，奈米片具有大於 2 之縱橫比。縱橫比為邊緣長度與厚度之比率。較佳地，奈米片具有約 2 至約 25，約 3 至約 20，約 5 至約 10，約 2 至約 15，或約 10 至約 30 之縱橫比。

[0039] 結合搭配物或目標分析物可使用與如上捕獲分子固定至金屬奈米層所述類似之方法來偶合或共軛至金屬奈米結構(例如複合奈米結構)。此等方法包括但不限於，EDC 共軛化學、磺基-NHS 偶合、疏水性結合或硫醚化學。結合搭配物或目標分析物可經由各種化學官能基包括硫醇、胺、二硫醇、丙烯酸亞磷醯胺、疊氮化物或炔來偶合至金屬奈米結構。

[0040] 在一些實施例中，用於沉積於表面上之金屬奈米層中的一種或多種金屬可與製造偵測共軛物中之金屬奈米結構之一種或多種金屬相同。舉例而言，在一實施例中，沉積於表面上之金屬奈米層包含金薄膜或複數個金奈米結構並且偵測共軛物包含金奈米結構。在其他實施例

中，用於沉積於表面上之金屬奈米層之金屬不同於用於產生偵測共軛物中之金屬奈米結構之一種或多種金屬。例如，在一些實施例中，沉積於表面上之金屬奈米層包含銀薄膜或複數個銀奈米結構並且偵測共軛物包含金奈米結構。在其他實施例中，沉積於表面上之金屬奈米層包含金薄膜或複數個金奈米結構並且偵測共軛物包含銀奈米結構。在某些實施例中，沉積於表面上之金屬奈米層包含金薄膜或複數個金奈米結構並且偵測共軛物包含複合奈米結構。在相關實施例中，複合奈米結構包含鍍金之銀奈米結構。在其他具體實施例中，沉積於表面上之金屬奈米層包含金薄膜或複數個金奈米結構並且偵測共軛物包含複合奈米結構，包括鍍金之銅奈米結構。在其他實施方案中，沉積於表面上之金屬奈米層包含金薄膜或複數個金奈米結構並且偵測共軛物包含複合奈米結構，包括鍍金之磁石奈米結構。在其他實施例中，沉積於表面上之金屬奈米層包含金薄膜或複數個金奈米結構並且偵測共軛物包含複合奈米結構，包括金及鹼金屬或鏷系元素。

[0041] 本發明亦包括包含如本文揭示之本發明之分析物偵測裝置的套組。在一實施例中，套組包含(i)含有複數個捕獲分子固定於其上之金屬奈米層之表面及(ii)包含如本文描述之複數個偵測共軛物之組合物。在某些實施例中，組合物與表面分開地封裝以使得其可隨後在執行偵測方法期間與表面接觸。在一些實施例中，將包括複數個偵測共軛物之組合物凍乾，例如，呈球團或顆粒形式。在相

關實施例中，含有金屬奈米層之表面可為晶片、圓盤或光析管。在一特定實施例中，含有金屬奈米層之表面為適合與離心轉子一起使用之光析管。在此等實施例中，金屬奈米層可沉積於光析管之蓋子、底部及/或壁上。

[0042] 在某些實施例中，本文所述分析物偵測系統之所有組分包含於離心轉子或圓盤內。例如，轉子或圓盤可含有一或多個反應腔室，其中定位含有固定捕獲分子及複數個偵測共軛物之金屬奈米層表面。在一實施例中，金屬奈米層表面為定位於反應腔室之底部之晶片。在另一實施例中，金屬奈米層直接沉積於反應腔室之底板上。在仍然另一實施例中，金屬奈米層表面為以金屬奈米層塗佈之顆粒(例如塑膠顆粒)。在所有此等實施例中，捕獲分子固定至金屬奈米層表面。在相關實施例中，複數個偵測共軛物以呈凍乾組合物，如凍乾顆粒或球團形式存在。

[0043] 在替代實施例中，捕獲分子共軛至金屬奈米結構，該等金屬奈米結構呈膠體懸浮體形式。將複數個偵測共軛物添加至存在試樣之懸浮液。若目標分析物存在於樣本中，在偵測共軛物與含有捕獲分子之懸浮奈米結構之間發生複合物形成，導致光學信號變化(例如，懸浮奈米結構之峰吸光率波長之移位)。

[0044] 因此，在一些實施例中，套組包含具有一或多個反應腔室之轉子或圓盤，其中每個反應腔室包含(i)包括如本文描述之複數個偵測共軛物之凍乾組合物及(ii)以金屬奈米層塗佈之顆粒，其中複數個捕獲分子固定至金屬

奈米層。此等套組提供一步式分析物檢測方法，其中試樣與轉子或圓盤接觸，並且將離心力施加至轉子或圓盤將試樣遞送至反應腔室，其中樣本與複數個偵測共軛物及含有固定捕獲分子之金屬奈米層塗佈顆粒混合。在轉子或圓盤含有一個以上反應腔室之實施例中，可選擇偵測共軛物及捕獲分子以使得可在每個反應腔室中偵測不同分析物。若轉子包含多個反應腔室，此等轉子格式偵測裝置可以夾心檢定格式、直接競爭格式或兩者來組配。

[0045] 本文論述之任何類型金屬奈米層或金屬奈米結構可與此等轉子格式偵測裝置一起使用。在一些實施例中，顆粒上之金屬奈米層塗層為金奈米層並且偵測共軛物中之金屬奈米結構為金奈米結構。在其他實施例中，顆粒上之金屬奈米層塗層為銀奈米層並且偵測共軛物中之金屬奈米結構為金奈米結構。在其他實施例中，顆粒上之金屬奈米層塗層為金奈米層並且偵測共軛物中之金屬奈米結構為銀奈米結構。在一實施例中，顆粒上之金屬奈米層塗層為用金奈米層覆蓋在其上之銀奈米層並且偵測共軛物中之金屬奈米結構為金奈米結構。在某些實施例中，顆粒上之金屬奈米層塗層為金奈米層並且偵測共軛物中之金屬奈米結構為複合奈米結構。例如，在一實施例中，複合奈米結構為鍍金之銀奈米結構。在另一實施例中，複合奈米結構為鍍金之銅奈米結構。

[0046] 本發明之套組亦可包括使用裝置來偵測試樣中之分析物的說明書，收集生物樣本之裝置或工具，及/

或自固體材料，如土壤、食物及生物組織獲得樣本之提取緩衝液。

[0047] 本發明亦提供偵測樣本中之目標分析物之方法。在一實施例中，方法包括：(i)將試樣與如本文描述之複數個偵測共軛物混合；(ii)使混合物與含有金屬奈米層之表面接觸，其中如本文描述之複數個捕獲分子固定至金屬奈米層；(iii)將表面暴露於紫外線-可見-紅外線光譜內之波長範圍下之光源；並且(iv)量測來自表面之光學信號，其中光學信號之變化指示樣本中之目標分析物之存在。

[0048] 在一些實施例中，偵測方法為夾心檢定。在此等實施例中，偵測共軛物包含偶合至結合搭配物之金屬奈米結構，該等結合搭配物能夠特異性結合至存在於樣本中之目標分析物以形成分析物-偵測共軛物複合物。固定至金屬奈米層表面之複數個捕獲分子亦能夠特異性結合至存在於樣本中之目標分析物。將金屬奈米層暴露於光源並且量測光學信號，其中光學信號之變化指示樣本中之分析物之存在。經由說明，當含有目標分析物之樣本與複數個偵測共軛物混合時，目標分析物結合至偵測共軛物中之結合搭配物以形成分析物-偵測共軛物複合物。此等複合物進而結合至經由分析物固定至金屬奈米層表面之複數個捕獲分子，從而使偵測共軛物中之金屬奈米結構緊鄰金屬奈米層表面。藉由金屬奈米層表面吸收或散射之光的量受複合物中之金屬奈米結構之接近性影響，因而產生峰吸收波

長之增強移位，從而指示樣本中之目標分析物之存在。

[0049] 在其他實施例中，偵測方法為競爭性檢定。在此等實施例中，偵測共軛物包含偶合至所關注目標分析物的金屬奈米結構。如在夾心檢定方法中，固定至金屬奈米層表面之複數個捕獲分子能夠特異性結合至目標分析物。在此類型檢定中，偵測共軛物最初結合至捕獲分子。若含有目標分析物之樣本與此等初始複合物混合，則樣本中之未標記或游離目標分析物與偵測共軛物競爭以結合至捕獲分子。此類型檢定中之光學信號之變化由於偵測共軛物中之金屬奈米結構自金屬奈米層表面之位移產生，從而相稱地減少峰吸收波長之波長移位。

[0050] 試樣可為任何類型液體樣本，包括生物樣本或自環境或食物樣本製備之提取物。在一特定實施例中，試樣為生物樣本。生物樣本包括但不限於，全血、血漿、血清、唾液、尿液、胸膜腔積液、汗液、膽液、腦脊液、糞便、陰道流體、精子、眼晶狀體液、黏液、滑液、腹膜液、羊水、活檢組織、唾液及細胞裂解物。生物樣本可自懷疑患有疾病病狀，如癌症、傳染病(例如，病毒、細菌、寄生蟲或真菌感染)、心血管疾病、代謝疾病自身免疫疾病等之人受試者或動物受試者獲得。生物樣本亦可自經歷常規醫學檢查之健康受試者(例如人類或動物)獲得。

[0051] 在該等方法之一些實施例中，試樣與複數個偵測共軛物混合並且隨後使得混合物與含有固定捕獲分子之金屬奈米層表面接觸。在其他實施例中，試樣與含有固

定捕獲分子之金屬奈米層表面接觸並且隨後添加複數個偵測共軛物。在某些實施例中，使得樣本、複數個偵測共軛物與含有固定捕獲分子之金屬奈米層表面同時接觸。例如，使樣本與兩種試劑同時接觸可在如上所述之轉子格式偵測裝置中發生。

[0052] 如上所述之任何分析物偵測裝置可用於本發明之偵測方法中。因此，本文所述之各種金屬奈米層表面、捕獲分子及偵測共軛物適用於偵測方法中。例如，在該等方法之一些實施例中，含有金屬奈米層之表面為晶片、孔、光析管或顆粒。在該等方法之某些實施例中，含有金屬奈米層之表面為併入或適合與離心轉子一起使用之光析管之壁及底部。在此等及其他實施例中，上之金屬奈米層表面為金屬薄膜，如金薄膜。在該等方法之其他實施例中，表面上之金屬奈米層包含固定於表面上之複數個金屬奈米結構，如金奈米結構。

[0053] 在偵測方法之某些實施例中，偵測共軛物包含偶合至結合搭配物或目標分析物之複合金屬奈米結構。如本文描述，複合金屬奈米結構包含至少兩種貴金屬或過渡金屬。在該等方法之一些實施例中，複合金屬奈米結構包含至少兩種選自金、銀、銅、鉑、鈀、鈳、銻、銨、鈦、鉻、鎳、鋅、鐵、鈷及鎳之金屬。在該等方法之其他實施例中，複合金屬奈米結構包含至少兩種選自金、銀、銅、鉑、鈀、鎳、鐵、鎳及鋅之金屬。在一特定實施例中，複合金屬奈米結構包含金及銀。在另一實施例中，

複合金屬奈米結構包含金及銅。在另一實施例中，複合金屬奈米結構包含銀及銅。用於本發明方法中之複合金屬奈米結構可包括許多不同幾何形狀，如球狀奈米顆粒、錐體奈米顆粒、六邊形奈米顆粒、納米管、奈米殼、奈米棒、奈米點、奈米島、奈米線、奈米盤、奈米立方塊或其組合。

[0054] 在某些實施例中，用於本發明方法中之複合金屬奈米結構為第一金屬與第二金屬之合金。在一些實施例中，用於本發明方法中之複合金屬奈米結構包含第一金屬之核心及第二金屬之塗層。在具體實施例中，複合金屬奈米結構包含銀核心及鍍金層。在其他實施例中，複合金屬奈米結構包含銅核心及鍍金層。在另一實施例中，核心為銀並且塗層為銅。在一些實施例中，複合金屬奈米結構中之每一者包含電介質核心(例如二氧化矽、硫化金、二氧化鈦、二氧化矽及聚苯乙烯)，第一金屬之第一塗層，及第二金屬之第二塗層。在偵測方法之一特定實施例中，核心為二氧化矽，第一塗層(即內塗層)為鍍銀層，並且第二塗層為鍍金層(即外塗層)。在另一實施例中，核心為二氧化矽，第一塗層(即內塗層)為銅塗層，並且第二塗層為鍍金層(即外塗層)。

[0055] 本發明偵測方法可用於判定目標分析物之定性或定量之量。此等方法尤其適用於判定樣本中之目標分析物之近似量，其尤其可用於診斷某些醫學病狀或評估藥物療法之功效。在一實施例中，可判定目標分析物之數

量，方法是藉由如本文對於具有已知量目標分析物之樣本所描述量測來自金屬奈米層表面之光學信號之變化來建立具體分析物之校準曲線；判定試樣之光學信號變化；並且將試樣之光學信號變化與對於校準曲線獲得之值比較。在一些實施例中，判定第一試劑與第二試劑之間之複合物之數量包括將來自試樣之吸光率及/或反應速率與具有已知量複合物之一個樣本之吸光率及/或反應速率比較，從而判定試樣中之複合物之數量。自試樣獲得之定量值可與預先確定之臨界值比較，其中該等預先確定之臨界值指示目標分析物之異常或正常水準。

[0056] 本發明之偵測方法提供偵測樣本中之極少量目標分析物之高度靈敏技術。如藉由工作實例展示，來自金奈米層表面之基於電漿共振之信號之放大可以金奈米結構共軛物達成以使得可偵測樣本中之奈克數量之目標分析物。因此，在該等方法之一實施例中，偵測奈克數量目標分析物之存在。發明者意外地發現來自金奈米層表面之基於電漿共振之信號之顯著更大放大可以複合金屬奈米結構共軛物來達成。使用共軛至分析物特異性抗體之鍍金之銀奈米結構使得能夠偵測皮克數量之目標分析物，如與以金奈米結構共軛物獲得者相比，靈敏度增加 1000 倍。參見實例 3。因此，在該等方法之一些實施例中，偵測皮克數量目標分析物之存在。在該等方法之其他實施例中，偵測毫微微克數量目標分析物之存在。更大靈敏度可藉由改變複合金屬奈米結構及/或金屬奈米層表面之組成及/或形狀

來獲得。

[0057] 當入射光施加於金屬奈米結構，金屬中之傳導帶電子在入射電磁波之相同頻率下共同地振盪。由於此等共振振盪，奈米結構強烈吸收並散射特定波長範圍之光。對於包含貴或過渡金屬之金屬奈米結構，此波長範圍在紫外線-可見-紅外線光譜中，取決於奈米結構之具體組成。因此，施加適用於本發明方法之電磁能的光源可包括可施加紫外線-可見光譜或紫外線-可見-紅外線光譜內之波長範圍的任何來源，包括弧光燈及雷射。在一些實施例中，光源可裝備單色器以使得特定波長之光可施加於金屬奈米層表面。

[0058] 金屬奈米層及奈米結構之光學性質取決於其尺寸、形狀及組成。例如，固體金奈米顆粒具有約 515 nm 至約 560 nm 之吸收峰波長($\lambda_{\text{最大}}$)，取決於粒徑。具有 30 nm 直徑之金球狀奈米顆粒在約 520 nm 下最大吸收，並且隨著粒徑增加， $\lambda_{\text{最大}}$ 移位至更長波長。銀及銅顆粒在紫外線/藍色或紅色區域(例如，約 350 nm 至約 500 nm)中具有 $\lambda_{\text{最大}}$ ，並且增加之粒徑導致 $\lambda_{\text{最大}}$ 移位至更長波長。金屬奈米棒具有橫向 $\lambda_{\text{最大}1}$ 及縱向 $\lambda_{\text{最大}2}$ 。不同金屬之合金通常展現構成金屬之吸收峰之間的中間範圍內之吸收峰。舉例而言，包含金與銀之 50/50 合金之奈米結構展現約 470 nm 之 $\lambda_{\text{最大}}$ ，並且金之增加量導致吸收峰移位至更長波長。LSPR 信號對於局部媒介折射係數之變化的靈敏度可藉由改變奈米結構之形狀或幾何結構來調節。例如，

如與球相比，非球形顆粒(例如奈米棱柱體、奈米棒、奈米殼等)具有增加之 LSPR 靈敏度。在一些實施例中，光學性質(例如具體波長下之吸收/散射)藉由改變沉積於表面上之金屬奈米層或用於偵測共軛物中之金屬奈米結構之尺寸、形狀或組成來針對具體應用加以定製。

[0059] 入射光與金屬奈米層表面之間之相互作用可作為反射光或透射光來監測。吸收或散射之入射光之量可作為反射模式中之吸收光譜或透射模式中之吸收光譜來量測。在一些實施例中，自金屬奈米層量測之光學信號可為光學反射、吸收光譜、散射光譜及/或發射光譜。

[0060] 由結合搭配物、目標分析物與捕獲分子之間之複合物形成所導致的金屬奈米層與偵測共軛物中之金屬奈米結構之間之電漿耦合產生金屬奈米層之局部表面電漿共振光譜之變化。例如，此等變化可包括增加之光學消光、增加之光學反射，及/或增加之散射及/或發射信號。在一些實施例中，指示樣本中之目標分析物之存在的光學信號之變化包括光學散射之移位、增加或減少或此等特徵之組合。在某些實施例中，指示樣本中之目標分析物之存在的光學信號之變化為光譜峰波長移位。在一實施例中，光學光譜峰之波長移位可為 200 nm 至 1200 nm 光譜窗內之紅移(例如，移位至更長波長)。在另一實施例中，光學光譜峰之波長移位可為 200 nm 至 1200 nm 光譜窗內之藍移(例如，移位至更短波長)。光學信號之變化可在設定反應期之後之具體時間點量測。另外或替代地，可量測在反

應期內的光學信號之變化(例如速率決定)。兩種類型量測可用於目標分析物之定性或定量分析。

[0061] 量測不同波長之光學信號及獲得消光、散射或發射光譜之各種方法在此項技術中為已知的。任何分光光度或光度儀器適用於所揭示的方法。一些非限制性實例包括酶標儀、Cobas Fara 分析器，及 Piccolo xpress[®]及 Vetscan 分析器(Abaxis, Inc., Union City, CA)、光纖讀出器(例如，LightPath™ S4 (LamdaGen, Menlo Park, CA))、SPR 儀器(例如，可自 GE Healthcare 獲得之 Biacore 儀器)、來自 Olympus, Hitachi 等之離心分析器。

[0062] 本發明亦包括檢定複合物，其包括(i)包含偶合至結合搭配物之複合金屬奈米結構之偵測共軛物，(ii)目標分析物，及(iii)捕獲分子固定於其上之金屬奈米層塗佈顆粒，其中偵測共軛物中之結合搭配物結合至目標分析物上之第一抗原決定基並且捕獲分子結合至目標分析物上之第二抗原決定基，從而形成包括偵測共軛物、目標分析物及捕獲分子之複合物。在一些實施例中，檢定複合物包含於適合與離心轉子一起使用之光析管中。在其他實施例中，檢定複合物包含於離心轉子或圓盤中之反應腔室內。

[0063] 檢定複合物中之結合搭配物及捕獲分子可為如上所述之任何類型之分子，包括半抗原及其他小分子，藥物，激素，生物大分子如抗體或其片段(例如，Fv、Fab、(Fab)₂、單鏈、CDR 等)，抗原，受體，配體，多核苷酸，適體，多肽，多醣，脂多醣，醣肽，脂蛋白，或核

蛋白。在一實施例中，結合搭配物為抗體並且捕獲分子為不同抗體。

[0064] 金屬奈米層及複合金屬奈米結構以上詳細描述。在一實施例中，塗佈顆粒(例如塑膠或玻璃球)之金屬奈米層為金奈米層。在另一實施例中，塗佈顆粒之金屬奈米層為銀奈米層。顆粒較佳小於 0.5 μm ，但是大於 0.1 μm 。在某些實施例中，複合金屬奈米結構為鍍金之銀奈米結構。在其他實施例中，複合金屬奈米結構為鍍金之銅奈米結構。在其他實施例中，金屬奈米結構包含用銀、銅離子或同時用此等離子來摻雜之金。

[0065] 任何類型目標分析物可使用本發明之方法、裝置及檢定複合物來偵測，尤其有效診斷疾病之彼等。目標分析物可包括但是不限於蛋白質、酶、抗原、抗體、肽、核酸(RNA、DNA、mRNA、miRNA)、激素、醣蛋白、多醣、毒素、病毒、病毒粒子、藥物分子、半抗原或化學品。在一些實施例中，目標分析物為與人及/或動物之傳染病相關之標記或抗原。在其他實施例中，目標分析物為與具體生理狀態或病理病狀相關之標記或抗原。

[0066] 在某些實施例中，目標分析物為致病抗原或致病抗原之抗體。例如，致病抗原可為病毒抗原(例如，貓白血病毒，犬細小病毒，足及口病毒，流感病毒，a型、b型、c型肝炎病毒，HIV病毒，人乳頭瘤病毒，愛潑斯坦-巴爾病毒，狂犬病病毒等)，細菌抗原(例如，埃裡希氏體屬，疏螺旋體屬，無形體屬，炭疽，沙門氏菌，桿

菌等)，真菌抗原，或寄生蟲抗原(例如，犬心絲蟲，梨形鞭毛蟲，惡性瘧原蟲，非洲錐蟲，布氏錐蟲等)。在其他實施例中，目標分析物為疾病相關抗原或疾病相關抗原之抗體。疾病相關抗原包括但不限於癌症相關抗原或標記(例如，PSA、AFP、CA125、CA15-3、CA19-9、CEA、NY-ESO-1、MUC1、GM3、GD2、ERBB2等)，心血管疾病相關抗原或標記(例如，肌鈣蛋白、C-反應蛋白、大腦利尿鈉肽、CKMB、脂肪酸結合蛋白等)，代謝相關抗原或標記(例如，促甲狀腺激素、甲狀腺素、細蛋白、胰島素)，或自身免疫疾病相關抗原或標記(例如，自身抗體)。在某些實施例中，目標分析物為炎症抗原或標記(例如，C-反應蛋白、MRP14、MRP8、25F9等)。在其他實施例中，目標分析物為妊娠相關抗原或標記(例如，胎抗原、人絨毛膜促性腺素)。

[0067] 本發明亦提供製備複合金屬奈米結構之方法。在一實施例中，該方法包含製備包含聚合物與氯金酸之混合物的第一溶液，製備包含銀或銅奈米結構之第二溶液，並且將第一溶液與第二溶液一起孵育一段時間，其中所得混合物包含鍍金之銀奈米結構或鍍金之銅奈米結構。所得混合物較佳具有約 515 nm 至約 670 nm，或約 520 nm 至約 560 nm 之峰吸光率。在一實施例中，所得混合物具有約 530 nm 之峰吸光率。

[0068] 用於製備第一溶液之聚合物可為聚乙烯吡咯啶酮、聚乙烯醇、聚丙烯酸酯、聚乙二醇、聚乙烯亞胺、

聚天冬胺酸、聚麩胺酸、各種樹膠、明膠或包括任何前述物質之混合聚合物中之任何一者。在一特定實施例中，聚合物為聚乙烯吡咯啉酮。不同類型塗佈奈米結構可藉由改變聚合物之分子量來獲得。聚合物之合適分子量範圍包括約 5,000 道爾頓至約 150,000 道爾頓、約 10,000 道爾頓至約 100,000 道爾頓、約 20,000 道爾頓至約 80,000 道爾頓。在一些實施例中，聚合物具有小於 50,000 道爾頓之分子量。在其他實施例中，聚合物具有小於 20,000 道爾頓之分子量。在某些實施例中，聚合物具有約 10,000 道爾頓之分子量。

[0069] 鍍金屬之特徵可藉由調整聚合物與氯金酸之濃度比來控制。例如，聚合物與氯金酸之濃度比為約 100:1 至約 1:100、約 2:1 至約 5:1 或約 1.5:1 至約 8:1。在一些實施例中，聚合物與氯金酸之濃度比為 1:1。聚合物之合適濃度包括但不限於水或乙醇中之約 0.1% 至約 20% 濕重。氯金酸之合適濃度包括但不限於約 0.001 M 至約 1.0 M，約 0.010 M 至約 0.500 M，及約 0.050 M 至約 0.100 M。

[0070] 塗層效率及厚度亦可受塗佈溶液(即第一溶液)之 pH 及鹵化物含量影響。在某些實施例中，溶液之 pH 保持在約 3 至約 14 範圍內。在一些實施例中，溶液之鹵化物含量小於 150 mM。在其他實施例中，溶液之鹵化物含量在約 0 至約 50 mM 範圍內。

[0071] 製備銀及銅奈米結構之溶液之方法為熟習此

項技術者已知。例如，包含銀或銅奈米結構之第二溶液可藉由美國專利公開案第 2012/0101007 號、美國專利公開案第 2014/0105982 號或美國專利公開案第 2013/0230717 號描述之任何方法來製備，其各自全部以引用方式併入本文。在一實施例中，包含銀或銅奈米結構之第二溶液藉由將銀或銅源與還原劑混合來製備。合適銀源包括銀鹽，如硝酸銀。合適銅源包括硫酸銅(II)、氯化銅(II)、氫氧化銅(II)及硝酸銅(II)、乙酸銅(II)及三氟乙酸銅(II)。我尖可與銀或銅源反應以形成奈米結構之還原劑可包括葡萄糖、抗壞血酸、硼氫化鈉，及聚合物如 PVP 之鹼性溶液(例如 pH 大於 7.5)。在某些實施例中，還原劑為抗壞血酸。銀奈米結構或銅奈米結構之所需形狀及光學光譜峰可藉由調整反應物之比率或濃度來實現，如普通熟習此項技術者已知。僅舉例而言，較高濃度之還原劑可產生五角形及雙錐形奈米結構，而較低濃度之還原劑可產生細長奈米線或管。根據奈米結構之具體形狀，包含銀或銅奈米結構之第二溶液可具有約 550 nm 至約 1000 nm，約 600 nm 至約 700 nm，約 630 nm 至約 680 nm，約 750 nm 至約 850 nm，約 900 nm 至約 940 nm，約 580 nm 至約 620 nm，或約 550 nm 至約 750 nm 之峰吸光率。在某些實施例中，包含銀奈米結構之第二溶液具有約 600 nm(即 595 nm 至 605 nm，包括端點)之峰吸光率。在一些實施例中，包含銅奈米結構之第二溶液具有約 585 nm(即 580 nm 至 590 nm，包括端點)之峰吸光率。在一些實施例中，與包含類似尺寸及形狀之

銀奈米結構之溶液之峰吸光率相比，包含銅奈米結構之溶液之峰吸光率更大(即紅移)。

[0072] 在一些實施例中，第一溶液與第二溶液之孵育期為至少 12 小時。在其他實施例中，第一溶液與第二溶液之孵育期大於 24 小時，較佳大於 48 小時，更佳至少 72 小時。反應混合物之峰吸光率之變化可在孵育期期間監測以相應地調整孵育時間。舉例而言，峰吸光率移位至較短波長，例如在 520 nm 至 550 nm 區域內，可指示鍍金之奈米結構已經穩定。在某些實施例中，氯化鈉(例如，0.25-1 M)之所得奈米結構之穩定性用於指示奈米結構之適當塗層。

[0073] 在某些實施例中，本發明提供合成具有大於約 50/mL 之光學密度之奈米結構之方法。在一實施例中，該等方法包括將如本文描述之聚合物與氯金酸混合，將混合物在設定溫度下攪拌第一時段，將抗壞血酸添加至混合物，並且將混合物孵育第二時段。奈米結構之尺寸及形狀藉由聚合物與氯金酸之濃度比以及孵育溫度及時間來決定。聚合物及氯金酸之濃度可在如上所述範圍內。溫度可基於所需奈米結構之尺寸及形狀來調節，但是可在約 4°C 至約 100°C 範圍內。同樣地，孵育期(即第一時段)可基於奈米結構之所需性質來調節，但是可在約 15 分鐘至一天範圍內。

[0074] 在一些實施例中，在第一孵育期之後，約 0.1 至 1 份之抗壞血酸(例如約 1 至 5 M)添加至混合物。添加

抗壞血酸之後的第二孵育期可為約 1 至約 24 小時。不受理論約束，添加抗壞血酸提供所產生奈米結構之數量之大幅度增加。

[0075] 在某些實施例中，該等方法進一步包括將混合物添加或摻雜約 1 至約 100 份之氯化金(例如約 0.001 M 至 1 M)或硝酸銀(例如約 0.001 M 至 1 M)或其他金屬(例如貴金屬、過渡金屬、鹼金屬或鑼系元素)。此摻雜步驟可進一步增加所得奈米結構之共振強度。在一些實施例中，在將抗壞血酸添加至反應之前，將氯化金、硝酸銀或其他金屬添加至混合物。在其他實施例中，在添加抗壞血酸之後，將氯化金、硝酸銀或其他金屬添加至混合物。金屬及抗壞血酸之添加順序可調節以將所得奈米結構定製為所需形狀及尺寸。

[0076] 本發明進一步藉由不應被視為限制之以下額外實例來例示。然而，根據本揭示案，熟習此項技術者應瞭解可在不脫離本發明之精神及範疇之情況下對所揭示之具體實施例進行許多改變且仍獲得相似或類似之結果。

[0077] 在整個本揭示案中提及之所有專利及非專利文件出於所有目的全部以引用方式併入。

實例

實例 1 金奈米顆粒共軛分析物之 LSPR 信號之放大

[0078] 分析物偵測系統藉由提供金奈米層薄膜沉積於其上之塑膠晶片來製備。人 IgG 蛋白質(100 $\mu\text{g/ml}$)固定

至金奈米層薄膜以產生感測器表面。控制傳感器藉由將牛血清白蛋白固定至金奈米層薄膜來構建。兩種類型之感測器表面定位於裝備有發光及集光纖維之儀器內，該等纖維將光照在金奈米層表面上並且收集自表面反射回來之光。

[0079] 含有游離蛋白質 A($10\ \mu\text{g/ml}$)之樣本與兩種類型感測器表面接觸並且量測反射譜之變化。如圖 1 展示，將游離蛋白質 A 引入含有固定人 IgG 之感測器不產生金奈米層薄膜之反射譜之顯著可見變化，如藉由峰波長之移位所量測。

[0080] 感測器表面藉由用 $1\ \text{mM}$ 鹽酸處理來再生並且將含有共軛至兩種不同濃度($3.5\ \mu\text{g/ml}$ 及 $0.175\ \mu\text{g/ml}$)之膠體金奈米顆粒(CGC)之蛋白質 A 的樣本與感測器表面接觸。當蛋白質 A(即目標分析物)共軛至膠體金奈米顆粒時，金奈米層表面之反射譜之變化加劇。詳言之，與 $10\ \mu\text{g/ml}$ 未標記蛋白質 A 相比， $3.5\ \mu\text{g/ml}$ 蛋白質 A-CGC 產生峰波長之更大移位。參見圖 1，感測器 2。電漿共振信號之放大足夠大以使得能夠偵測奈克濃度之蛋白質 A-CGC。參見圖 1，感測器 3。BSA 感測器之反射譜之變化代表蛋白質 A 分子非特異性結合至感測器表面並且與蛋白質 A 分子特異性結合至固定 IgG 分子誘導之變化相比，顯著更小。

[0081] 此初始實驗之結果表明由金屬奈米層表面處之結合事件所誘導的定域表面電漿共振信號之變化之顯著放大可藉由將目標分析物偶合至膠體金奈米顆粒來達成。

對於所偵測的奈克數量之分析物，觀察到靈敏度改良幾乎 60 倍。

實例 2 夾心檢定中之 LSPR 信號之放大

[0082] 此實例描述一系列實驗，其被設計來評估是否使用金奈米顆粒共軛物之定域表面電漿共振信號之放大也可在目標分析物不直接共軛至金奈米顆粒之夾心檢定格式中達成。金奈米層晶片表面如實例 1 描述來製備。將針對 C-反應蛋白(CRP)(100 $\mu\text{g/ml}$)之 C7 抗體固定至沉積於晶片表面上之金奈米層薄膜以產生抗-CRP 感測器。將識別與 C7 抗體相比而有所不同的非重疊 CRP 抗原決定基的 C6 抗體共軛至膠體金奈米顆粒(C6-CGC)用於一些實驗或以未標記形式用於其他實驗。

[0083] 在第一系列實驗中，含有三種不同濃度之 CRP(1 ng/ml 、10 ng/ml 或 100 ng/ml)之一的樣本與抗-CRP 感測器一起孵育 15 至 20 分鐘並且監測金奈米層之反射譜之變化。如圖 2 展示，在 CRP 結合至感測器表面上之固定 C7 抗-CRP 抗體後，觀察到很小峰移位。隨後感測器表面暴露至未標記 C6 抗-CRP 抗體(1 $\mu\text{g/ml}$)不導致顯著進一步峰移位。參見圖 2。同樣地，隨後感測器表面暴露至 3 $\mu\text{g/ml}$ 之 C6-CGC 不產生反射譜之任何進一步變化，指示結合 CRP 分子可能以未標記 C6 抗體飽和。參見圖 2。

[0084] 在第二系列實驗中，含有三種不同濃度之

CRP(1 ng/ml、10 ng/ml 或 100 ng/ml)之一的樣本與抗-CRP 感測器一起孵育 15 至 20 分鐘。隨後引入兩種不同濃度之 C6-CGC(1 μ g/ml 及 3 μ g/ml)並且量測反射譜之變化(圖 3 及 4A)。結果表明如與未標記 C6 抗體相比，使 C6 抗-CRP 抗體共軛至金奈米顆粒放大峰波長移位。增加濃度之 C6-CGC 產生峰波長之劑量依賴性移位。然而，1 ng/ml 與 10 ng/ml 之間之信號差異較小(圖 4B)。

[0085] 在第三系列實驗中，評估分析物孵育時間對於信號顯現之效應。抗-CRP 感測器與含有 0 ng/ml、10 ng/ml，或 100 ng/ml CRP 之樣本接觸並且立即引入 3 μ g/ml C6-CGC 而無任何分析物孵育時間或洗滌。如圖 5 及 6 展示，較短分析物孵育時間產生較小峰波長移位。

[0086] 此等三組實驗之結果表明 LSPR 信號之放大可使用金奈米顆粒共軛物以夾心檢定格式來達成。如與未標記抗體相比，當偵測器抗體用膠體金顆粒標記時，觀察到增強之信號移位，從而允許偵測奈克濃度之分析物。

實例 3 鍍金之銀奈米結構之增強信號放大

[0087] 為了檢查是否改變用於標記結合搭配物之金屬之類型影響 LSPR 信號之放大，製備複合金屬奈米結構。詳言之，鍍金之銀奈米結構製備如下。藉由添加 50.0 mL 去離子 H_2O 、500.0 μ L 檸檬酸三鈉(75mM)、200 μ L $AgNO_3$ (200mM)及 500.0 μ L H_2O_2 (27%)同時強力地攪拌在室溫下來製備銀奈米結構。然後，將 500 μ L 等分試樣之

NaBH₄(200mM)快速注入水溶液，導致變色為淡黃色。在幾分鐘時間內，顏色繼續自暗黃色變化至紅色至紫色並且最後穩定於藍色。UV/Vis 光譜判定溶液之峰吸光率為 604.5 nm。

[0088] 藉由將 5.0 mL 藍色溶液添加至 50 μ L 聚乙烯吡咯啉酮(PVP MW $\approx$ 10,000 乙醇中之 20%)與 50 μ L 之 HAuCl₄(20mM)之混合物來將鍍金層添加至銀奈米結構。72 小時孵育時間之後，樣本變為暗紅色並且具有 534.5 nm 之峰吸光率。奈米顆粒在 20,000 rpm 下離心 20 分鐘來洗滌兩次並且重新懸浮於 2.0 mL 去離子 H₂O 中。溶液具有深紅色、530.3 nm 之吸收峰，及 15.0 OD 單位之總吸光率。

[0089] 鍍金之銀奈米結構(Au@AgNPs)共軛至 C6 抗-CRP 抗體藉由添加 600.0 μ L Au@AgNPs 及 20.0 μ L C6 抗-CRP 抗體(8.0 mg/mL)至 880.0 μ L 去離子 H₂O 來執行，使最終抗體濃度達到 17.8 μ g/mL/OD。在 4°C 下 2 小時孵育期之後，樣本在 30,000g 下離心 20 分鐘並且重新懸浮於含有 PBS 中之 BSA(10 mg/mL)的 1.5 mL 阻斷溶液中。共軛至抗-CRP C6 抗體之 Au@AgNPs 儲存於 4°C 下直到進一步使用為止。

[0090] 抗-CRP 金奈米層感測器如實例 2 描述來製備並且具有 530 nm 下之峰吸收。亦製備含有金奈米層沒有任何固定抗體之控制傳感器。感測器用 100 μ L PBS 平衡。

[0091] 在 PBS 中稀釋至 1.5 OD 之共軛至 Au@AgNPs 之 100 μ L C6 抗-CRP 抗體與 1、10 或 500 pg/mL CRP 抗原一起預混合 1 分鐘。然後使混合物與抗-CRP 或控制傳感器表面接觸並且量測金奈米層表面之反射譜之變化。結果表明鍍金之銀奈米結構增強由 CRP-抗體複合物結合至感測器表面所誘導的峰波長移位(圖 7)。使用鍍金之銀奈米結構來偵測 1 pg/mL 之 CRP 抗原是可能的，如與以金奈米顆粒獲得者相比，靈敏度改良 1000 倍。在較高濃度之抗原下，結合部位飽和並且沒有進一步移位發生。

[0092] 此實驗之結果證明在複合奈米結構，如鍍金之銀奈米結構，用於標記分析物結合搭配物時，達成來自金屬奈米層表面之 LSPR 信號之顯著增強放大。

實例 4 合成較高光密度奈米結構

[0093] 金奈米顆粒藉由將 1 ml 最終體積之以下試劑以所指示順序混合來製備：0.1 ml 之 1% PVP-10(1% wt/wt)、0.2 ml 之 0.1M 氯化金、0.1 ml 之 5N NaOH、0.4 ml 水及 0.2 ml 之 1M 抗壞血酸。在每次添加之後，將反應混合物混合。光譜量測指示在室溫下 24 小時之後，反應大部分完成。此協定產生球狀金奈米顆粒，其展現約 535 nm 之 LSPR 峰及每 ml 約 80 之對應光密度。藉由額外金或銀之成層藉由將硝酸銀或氯化金添加至預成型金奈米顆粒來進行。過量試劑藉由在 30,000 g 下離心 1-2 小時來移除。

[0094] 在單獨反應中，0.05 ml 之 20% PVP(wt/wt)與 0.25 ml 水、0.1 ml 之 5N NaOH、0.1 ml 之 1 M 檸檬酸鈉、0.5 ml 之 0.1M 氯化金及 1 ml 之 1M 抗壞血酸混合。此協定導致立即形成約 90 OD/ml 以及~525 nm 之 LSPR 峰的膠體金顆粒。在最終 OD 與最終反應混合物中之 2.5 mM 金與 25 mM 金之間之金濃度之間觀察到線性對應。

[0095] 應瞭解所揭示的本發明不限於所描述具體方法、協定及材料，因為此等可變化。亦應瞭解本文所用之術語係僅出於描述特定實施例之目的，且不欲限制本發明之範疇，本發明之範疇將僅由隨附申請專利範圍限定。

[0096] 熟習此項技術者將僅使用常規實驗即會認識到或能夠確定本文所述之本發明之特定實施例的許多等效物。此等等效物意欲由以下申請專利範圍涵蓋。

申請專利範圍

1. 一種分析物偵測裝置，其包括：

複數個偵測共軛物，其中該等共軛物包含偶合至目標分析物或偶合至能夠特異性結合至目標分析物之結合搭配物的複合金屬奈米結構，其中該等複合金屬奈米結構中之每一者包含銀核心及鍍金屬；

含有金屬奈米層之表面；及

複數個捕獲分子，其中該等捕獲分子固定於該金屬奈米層上並且能夠特異性結合至該目標分析物。

2. 如申請專利範圍第 1 項之分析物偵測裝置，其中該等複合金屬奈米結構為球狀奈米顆粒並且具有約 5 nm 至約 200 nm 之直徑；或

其中該等複合金屬奈米結構為具有約 10 nm 至約 800 nm 之邊緣長度及約 1 nm 至約 100 nm 厚度之奈米片。

3. 如申請專利範圍第 1 項之分析物偵測裝置，其中該等複數個偵測共軛物呈凍乾球團或顆粒形式。

4. 如申請專利範圍第 1 項之分析物偵測裝置，其中該表面為晶片、孔、顆粒或光析管之壁、蓋子及/或底部。

5. 如申請專利範圍第 1 項之分析物偵測裝置，其中該金屬奈米層為金屬薄膜，其中該金屬薄膜包含金、銀、銅、鉑、鈀、鎘、鋅或其複合物；或

其中該金屬奈米層包含固定於該表面上之複數個金屬奈米結構，其中該等複數個金屬奈米結構包含金、銀、

銅、鉑、鈮、鎳、鋅或其複合物。

6. 如申請專利範圍第 1 項之分析物偵測裝置，其中該等複合金屬奈米結構具有選自球狀奈米顆粒、錐體奈米顆粒、六邊形奈米顆粒、奈米殼、納米管、奈米棒、奈米點、奈米島、奈米線或其組合之幾何結構。

7. 如申請專利範圍第 1 項之分析物偵測裝置，其中該等結合搭配物及/或捕獲分子為抗體、抗原、多肽、多核苷酸、核蛋白、適體、配體、受體或半抗原。

8. 如申請專利範圍第 1 項之分析物偵測裝置，其中該目標分析物為與傳染病、生理狀態或病理病狀相關之標記或抗原，或其中該目標分析物為犬心絲蟲、貓白血病毒、犬細小病毒、C-反應蛋白、梨形鞭毛蟲、埃裡希氏體屬抗原或抗體、疏螺旋體屬抗原或抗體、無形體屬抗原或抗體、癌症抗原、心臟標記抗原、促甲狀腺激素、甲狀腺素、肌鈣蛋白或大腦利尿鈉肽。

9. 如申請專利範圍第 2 項之分析物偵測裝置，其中該複合金屬奈米結構為球狀奈米顆粒並且具有約 10 nm 至約 100 nm 之直徑。

10. 如申請專利範圍第 5 項之分析物偵測裝置，其中該金屬薄膜包含金。

11. 如申請專利範圍第 5 項之分析物偵測裝置，其中該等複數個金屬奈米結構為金奈米結構。

12. 如申請專利範圍第 7 項之分析物偵測裝置，其中該等結合搭配物為識別目標分析物之第一抗原決定基之抗

體並且該等捕獲分子為識別目標分析物之第二抗原決定基之不同抗體。

13. 一種使用如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之分析物偵測裝置偵測樣本中之目標分析物之方法，其包括：

將該樣本與複數個偵測共軛物混合，其中該等共軛物包含偶合至結合搭配物之複合金屬奈米結構，該等結合搭配物能夠特異性結合至存在於該樣本中之該目標分析物以形成分析物-偵測共軛物複合物；

將該混合物與含有金屬奈米層之表面接觸，其中複數個捕獲分子固定於該金屬奈米層上並且能夠特異性結合至存在於該樣本中之該目標分析物；

將該表面暴露於該紫外線-可見-紅外線光譜內之波長範圍下之光源；及

量測來自該表面之光學信號，其中該光學信號之變化指示該樣本中之該目標分析物之存在。

14. 如申請專利範圍第 13 項之方法，其中

a) 該光學信號為反射、吸收光譜、散射光譜或發射光譜；

b) 該光學信號之該變化包括光譜峰波長移位；

c) 偵測奈克、皮克或毫微微克數量之該目標分析物之該存在；或

d) 該表面為併入離心轉子中之光析管之該等壁及底部。

15. 一種製備複合金屬奈米結構之方法，其包括：
製備包含聚合物與氯金酸之混合物的第一溶液；
製備包含銀奈米結構之第二溶液；及
將該第一溶液與該第二溶液一起孵育一段時間，其中
該所得混合物包含鍍金之銀奈米結構。

16. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該第二溶液包含銀奈米結構並且具有約 550 至 750 nm 之峰吸光率，或其中該聚合物為聚乙烯吡咯啉酮、聚乙烯醇、聚丙烯酸酯、聚乙二醇或聚乙烯亞胺。

17. 一種檢定複合物，其包括：
包含偶合至結合搭配物之複合金屬奈米結構之偵測共軛物，其中該等複合金屬奈米結構中之每一者包含銀核心及鍍金層；

目標分析物；及
捕獲分子固定於其上之金屬奈米層塗佈顆粒，其中該偵測共軛物中之該結合搭配物結合至該目標分析物上之第一抗原決定基並且該捕獲分子結合至該目標分析物上之第二抗原決定基，從而形成包含該偵測共軛物、目標分析物及該捕獲分子之複合物。

18. 如申請專利範圍第 17 項之檢定複合物，其中
a) 該結合搭配物為抗體並且該捕獲分子為不同抗體；
b) 該金屬奈米層為金屬薄膜，其中該金屬薄膜包含金、銀、銅、鉑、鈮、鎳、鋅或其複合物；或

c) 該金屬奈米層包含固定於該顆粒上之複數個金屬奈米結構，其中該等複數個金屬奈米結構包含金、銀、銅、鉑、鈮、鎳、鋅或其複合物。

19. 如申請專利範圍第 18 項之檢定複合物，其中該金屬薄膜包含金。

20. 如申請專利範圍第 18 項之檢定複合物，其中該等複數個金屬奈米結構為金奈米結構。

圖式

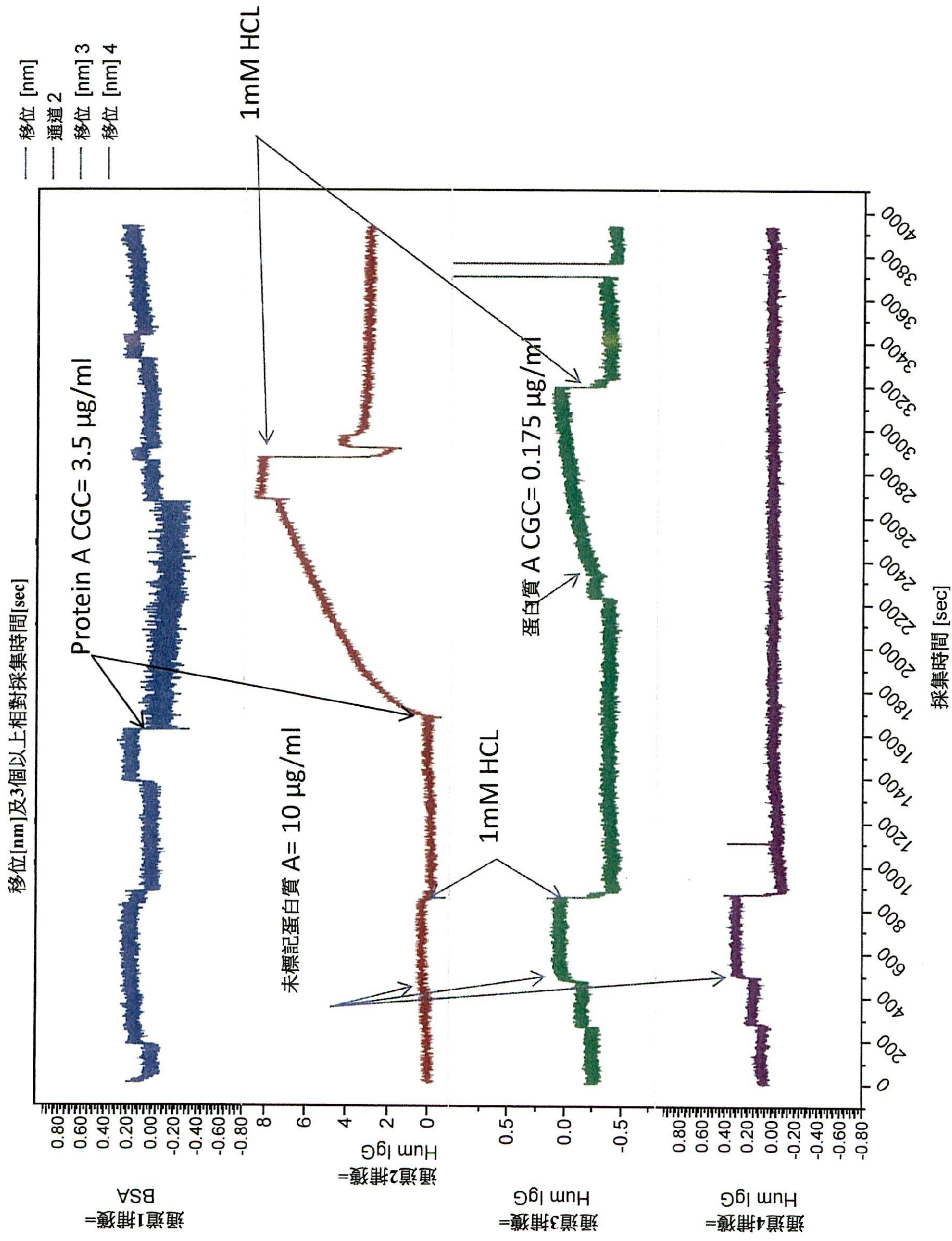


圖 1

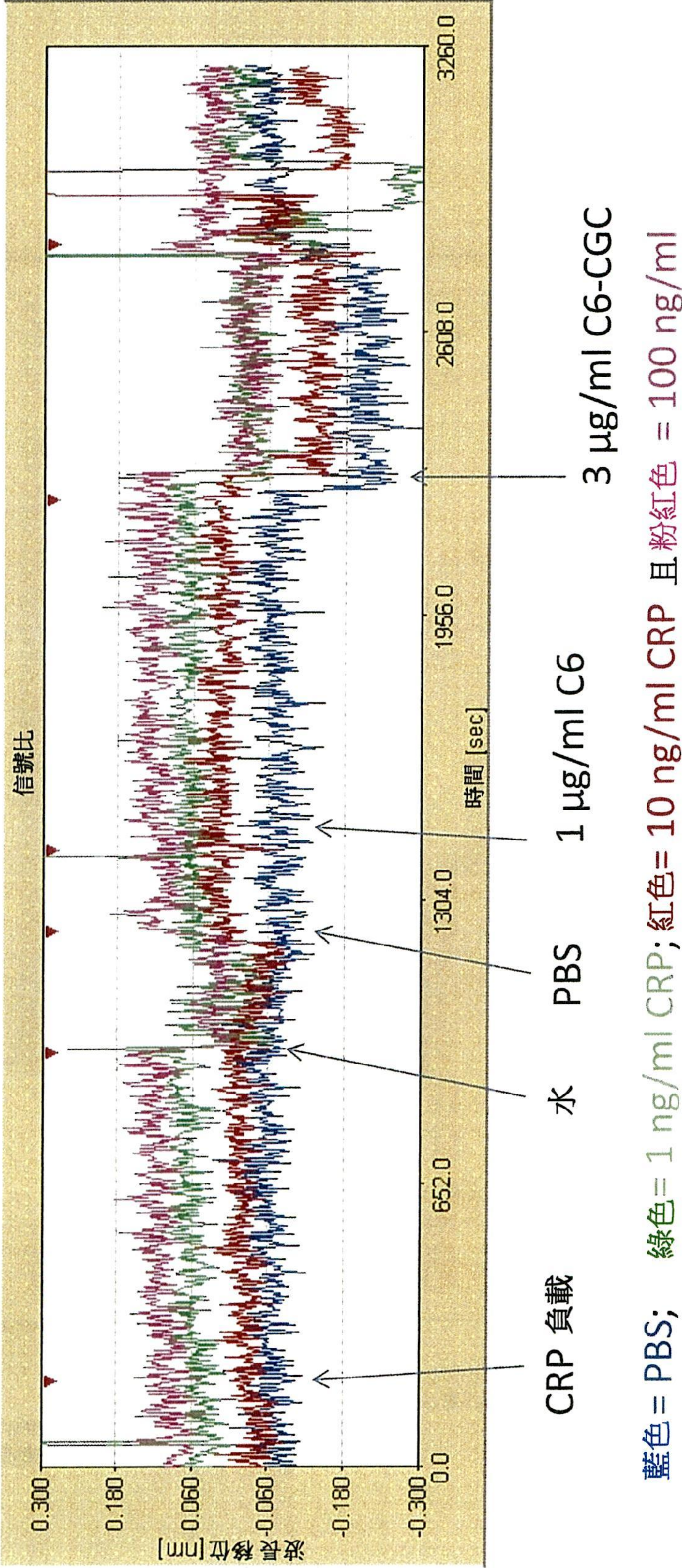
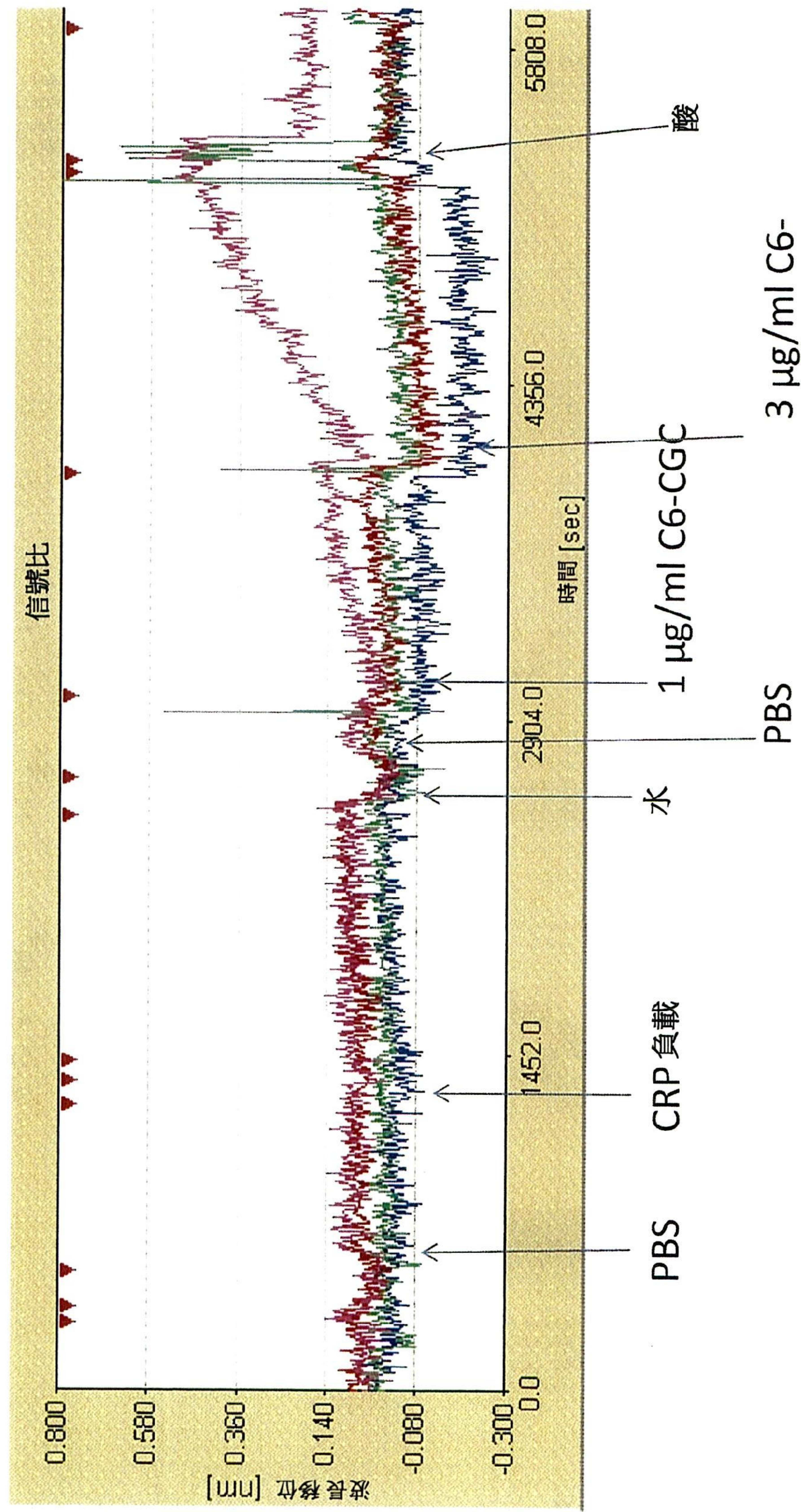


圖 2



藍色 = PBS; 綠色 = 1 ng/ml CRP; 紅色 = 10 ng/ml CRP 且 粉紅色 = 100 ng/ml CRP

圖 3

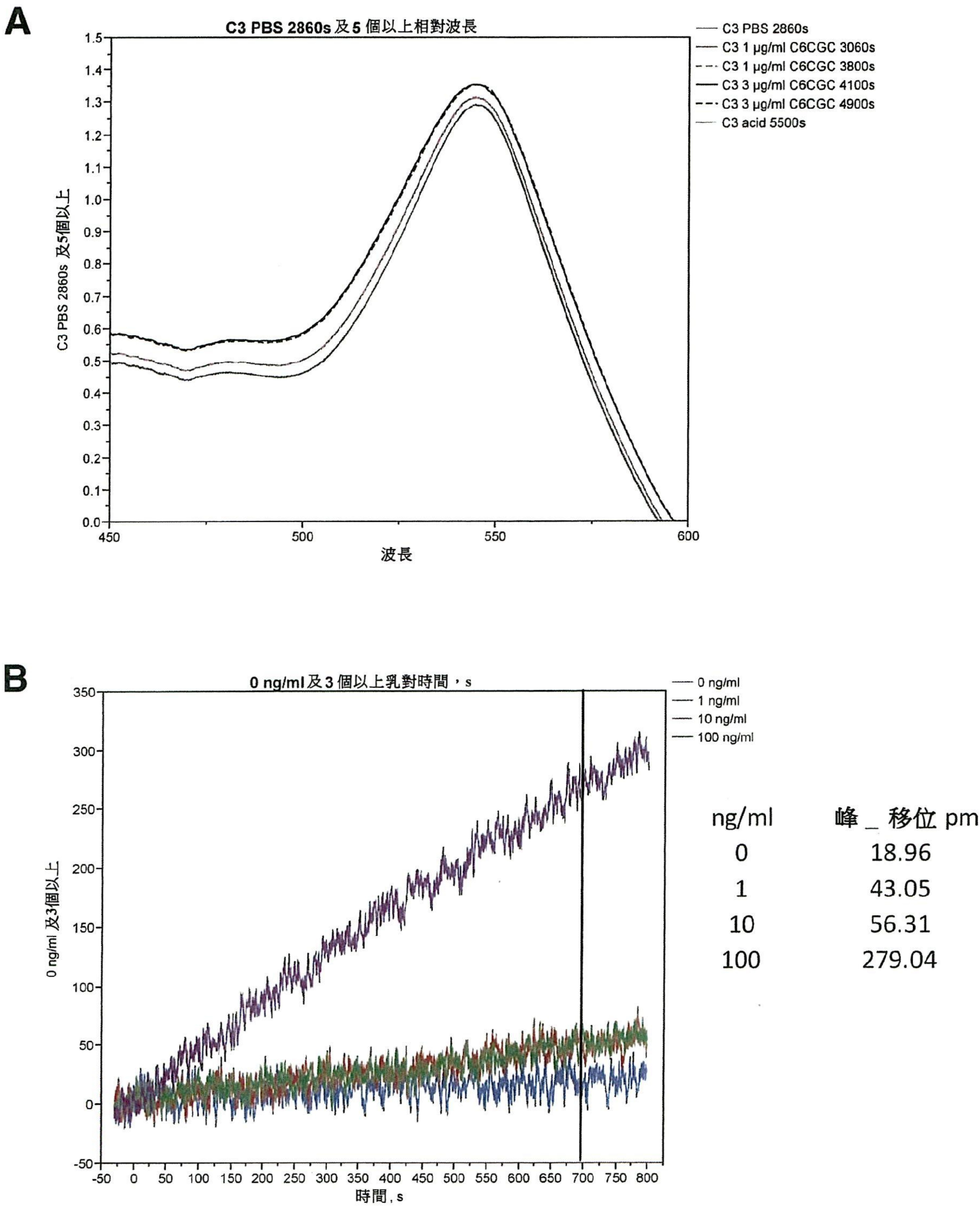
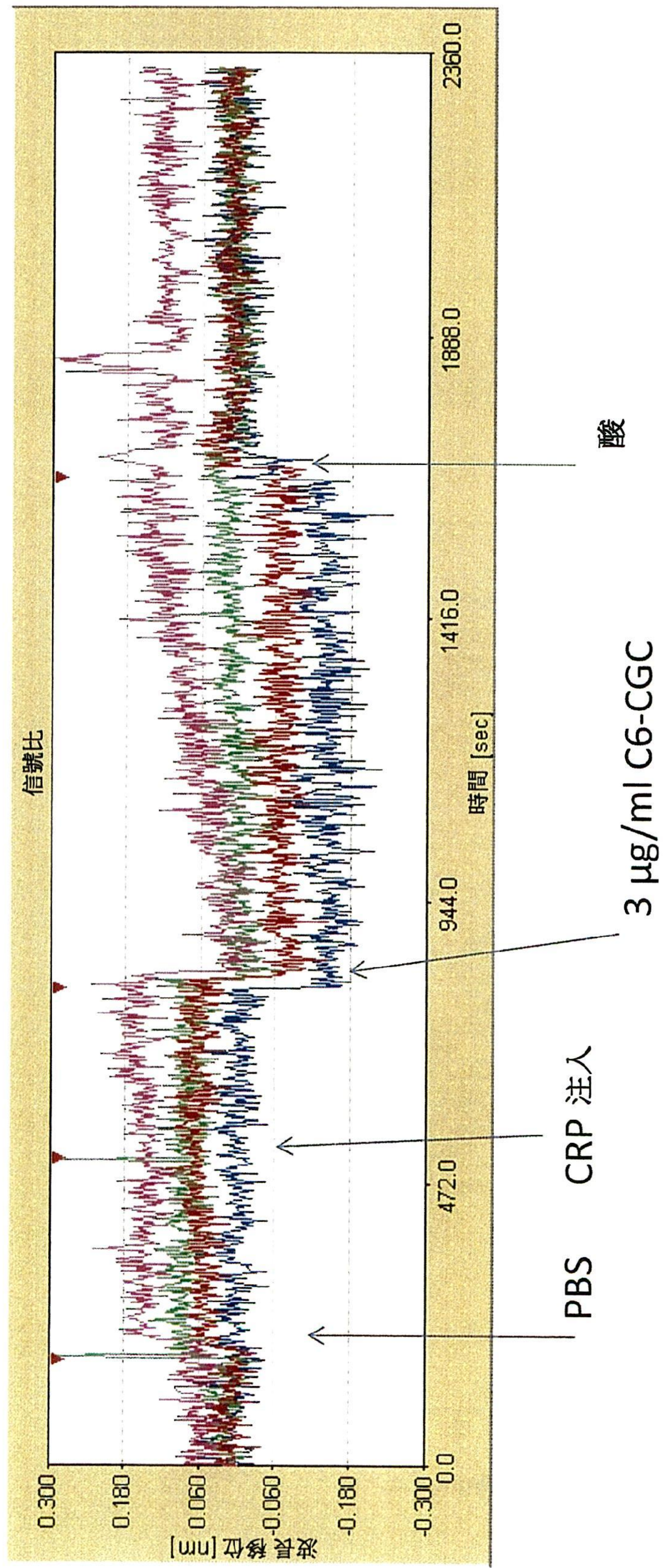


圖 4



藍色 = PBS; 綠色 = 10 ng/ml CRP; 紅色 = 10 ng/ml CRP 且 粉紅色 = 100 ng/ml CRP

圖 5

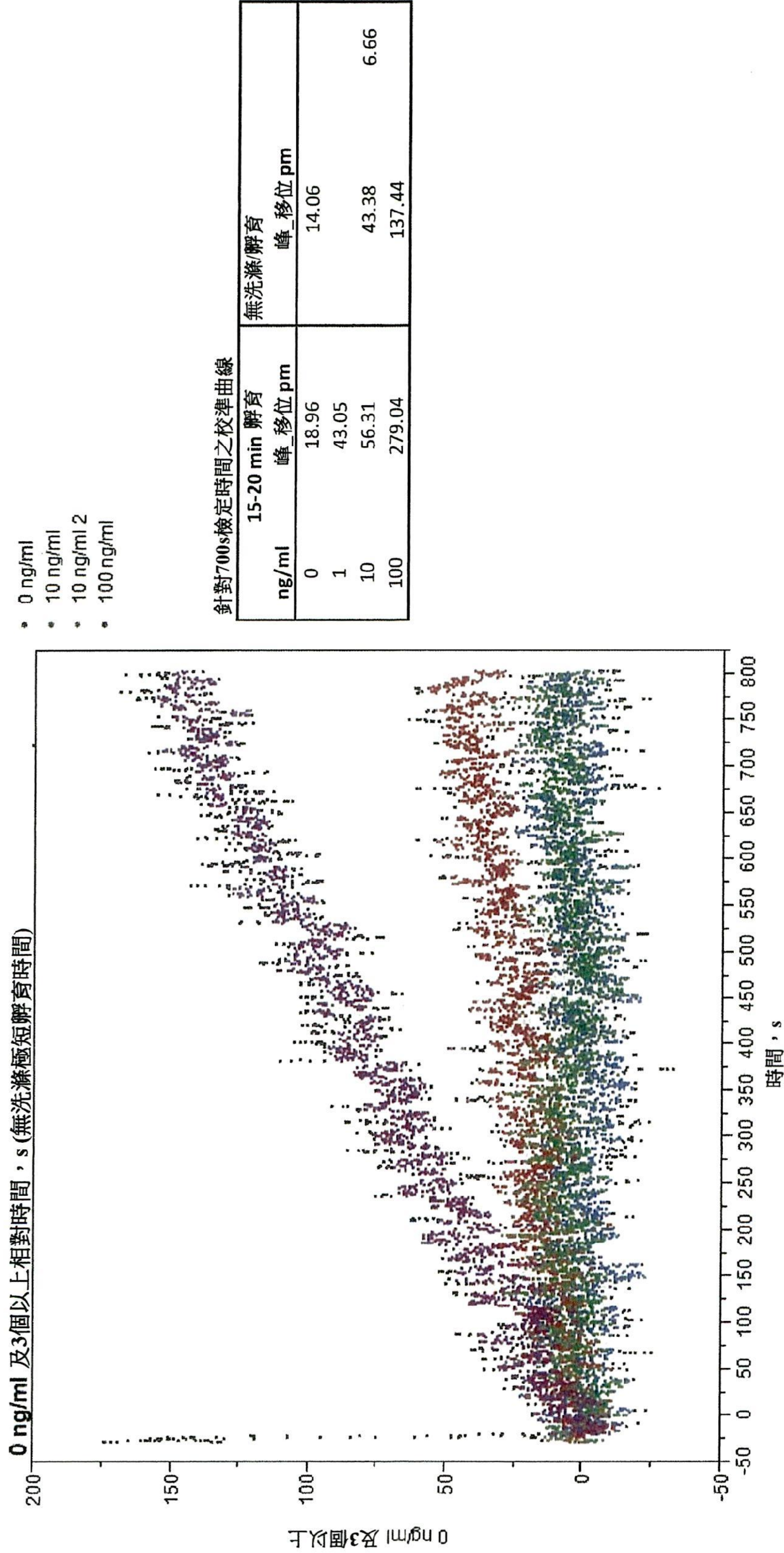


圖 6

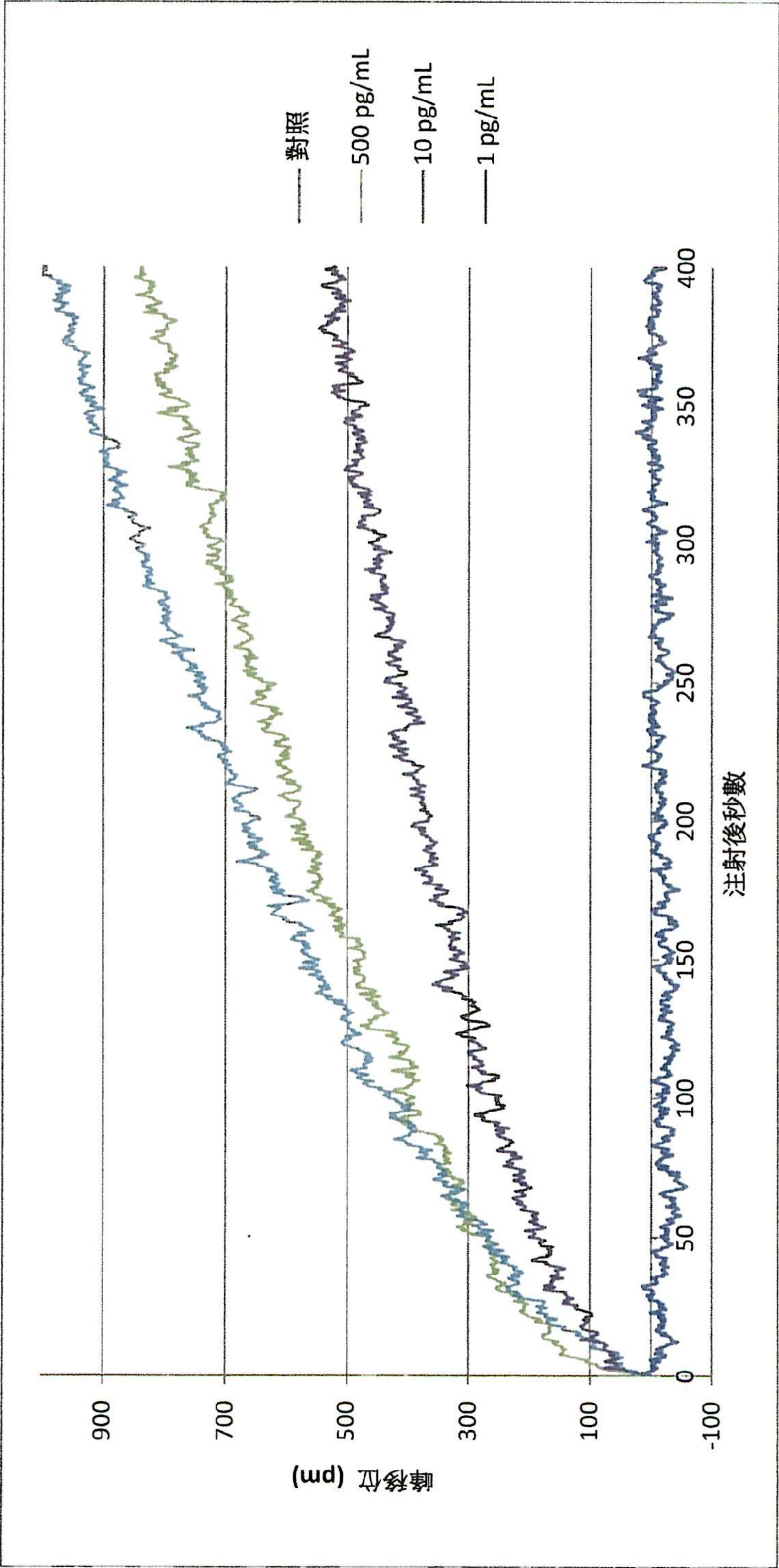


圖 7