





## 【發明說明書】

【中文發明名稱】分析物濃度的檢測方法

【英文發明名稱】DETECTION METHOD FOR  
DETECTING ANALYTE CONCENTRATION

### 【技術領域】

【0001】本發明是有關於一種分析物濃度的檢測方法，且特別是有關於一種利用二分法和粒子在溶液中的熱擴散度，來判斷分析物濃度高於或低於標準值的檢測方法。

### 【先前技術】

【0002】隨醫學日漸進步，非侵入式的疾病檢測發展逐漸成為研發重點。舉例而言，在糖尿病之視網膜病變的檢測中，常見的非侵入式疾病檢測可例如為眼部斷層掃描，但無論是儀器或是檢測費用都十分昂貴。另一種檢測方式為螢光血管照影，然需在靜脈施打螢光染劑，屬於侵入式的檢測方式。針對上述問題，應發展出可快速篩檢、價格便宜且非侵入式的檢測方法。

【0003】目前有一種方法是將抗原標準品標記螢光，並將上述抗原對應的抗體接附於載體上(後稱抗體載體)。之後，將待測抗原樣品、抗原標準品及抗體載體混合，使待測抗原樣品與抗原標準品進行競爭反應，以與抗體載體結合。之後，利用抗原標準品上的螢光標記觀測其布朗運動的情形。自由態的抗原標準品越多代表待測樣品濃度越高，從而

可得知待測抗原樣品濃度之高低。然而，此習知方法的缺點在於，將待測抗原樣品與抗原標準品混合的方法，使得同一抗原標準品無法重複使用來檢測多組待測抗原樣品，增加檢測成本。此外，此習知方法也可能增加樣品污染的風險。

**【0004】** 另一種方法係利用接附有對應待測分析物之第一結合配偶體的至少二種大小不同且具有特定尺寸比的第一粒子，來增加可偵測的濃度動態範圍(Dynamic range)。具體而言，將大的第一粒子、小的第一粒子，及具有標記和可與上述第一結合配偶體接合的第二結合配偶體的第二粒子，同時加入具有待測分析物的樣品溶液中。接著，第二粒子與待測分析物進行競爭反應，以與大的第一粒子或小的第一粒子接合。藉由大/小第一粒子和第二粒子之接合訊號的大小，判斷待測分析物的濃度。然而，上述方法要判斷出分析物的濃度，至少需在待測樣品中額外加入至少三種粒子，增加檢測複雜性。此外，此習知方法對於大/小第一粒子的尺寸限制極為嚴格，造成應用上的限制。

**【0005】** 尚有另一種方法是在奈米粒子的表面上接上抗體，以形成抗體摻雜。然後，將抗體摻雜加入含抗原的待測溶液中。之後，檢測待測溶液中抗體和抗原結合後，奈米粒子布朗運動效應的改變量，並根據事前利用標準品所製作的檢量線推算所檢測的抗原濃度。然而，此方法須使用檢量線，故當待測樣品未落於檢量線的範圍時，或是更換待測樣品種類時，則需要更多的準備工作來完成分析物濃度之檢測，也使可偵測的最低濃度受到限制(即偵測靈敏度不佳)。

因此，上述方法也不適用於疾病的快速篩檢上。再者，為增加抗體接上奈米粒子後所產生的相對體積差異(影響布朗運動變化量)，此習知方法所使用的奈米粒子的粒徑較小，製備較困難，且可偵測的濃度動態範圍小。

**【0006】** 因此，目前亟需提出一種分析物濃度的檢測方法，其可具有良好的靈敏度、低偵測極限、廣動態範圍、操作簡易且快速、再現性高之優點，以克服上述種種問題。

### **【發明內容】**

**【0007】** 本發明之一態樣在於提供一種分析物濃度的檢測方法。在一實施例中，上述檢測方法包含下述步驟。首先，提供至少二反應溶液，至少二反應溶液的每一者包含第一複合體，且第一複合體包含標記粒子、固定於標記粒子表面之結合配偶體以及與結合配偶體結合的受質。接下來，於上述至少二反應溶液的一者中，同時加入標準分析物以及金屬奈米粒子，以形成第二複合體，其中金屬奈米粒子具有上述之結合配偶體，且標準分析物在至少二反應溶液之一者中具有已知濃度。然後，於上述至少二反應溶液的另一者中，同時加入包含待測分析物之樣本以及上述金屬奈米粒子，以形成第三複合體，其中待測分析物於上述反應溶液的另一者中具有待測濃度，標記粒子之等效粒徑大於金屬奈米粒子之等效粒徑，且受質、標準分析物以及待測分析物實質為相同物質。然後，利用光源檢測第二複合體的第一熱擴散度以及第三複合體的第二熱擴散度。接著，進行判斷分析物濃度的步

驟，其中當第一熱擴散度小於第二熱擴散度時，判斷待測濃度大於已知濃度，或是當第一熱擴散度大於第二熱擴散度時，判斷待測濃度小於已知濃度。

【0008】 依據本發明之一些實施例，在利用光源檢測第一熱擴散度和第二熱擴散度時，可更包含對上述金屬奈米粒子施加雷射。

【0009】 依據本發明之一些實施例，所述金屬奈米粒子可具有不大於80奈米之等效粒徑。

【0010】 依據本發明之一些實施例，所述標記粒子具有100奈米以上之等效粒徑。

【0011】 依據本發明之一些實施例，標記粒子和金屬奈米粒子的等效粒徑比可為2.5至125。

【0012】 依據本發明之一些實施例，所述金屬奈米粒子之材料包含金。

【0013】 依據本發明之一些實施例，所述標記粒子之材料包含螢光化合物。

【0014】 依據本發明之一些實施例，所述雷射之功率不大於0.23 mW。

【0015】 依據本發明之一些實施例，所述樣本包含淚液、血液、尿液、血清或其他生物樣本。

【0016】 依據本發明之一些實施例，所述待測濃度為至少10 pg/ml。

【0017】 依據本發明之一些實施例，所述光源激發第二複合體和第三複合體各自之標記粒子。

【0018】 依據本發明之一些實施例，所述光源包含汞燈、氙燈或金屬鹵化物燈。

【0019】 依據本發明之一些實施例，所述結合配偶體包含抗原、抗體、受體或配體。

【0020】 依據本發明之一些實施例，所述受質、標準分析物和待測分析物分別包含前述結合配偶體的抗原之抗體、前述結合配偶體的抗體之抗原、前述結合配偶體的受體之配體，或前述結合配偶體的配體之受體。

【0021】 本發明之分析物濃度的檢測方法，藉由二分法之進行而可增加偵測靈敏度和動態範圍、降低偵測極限、操作簡單並具有良好的再現性。上述分析物濃度的檢測方法可應用於非侵入式的疾病篩檢。

#### 【圖式簡單說明】

【0022】 為讓本發明之上述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之詳細說明如下：

[圖1]根據本發明之一些實施例所述之分析物濃度的檢測方法繪示形成第一複合體的流程示意圖。

[圖2]根據本發明之一實施例所述之分析物濃度的檢測方法繪示形成第二複合體的流程示意圖。

[圖3A]繪示形成待測組之第三複合體300A的示意圖。

[圖3B]繪示形成待測組之第三複合體300B的示意圖。

[圖4]繪示含有第二複合體或第三複合體之樣品的承載裝置之示意剖面圖。

[圖5A]至[圖5B]繪示本發明實施例1的熱擴散度檢測結果之長條圖。

[圖5C]至[圖5D]繪示本發明實施例2的熱擴散度檢測結果之長條圖。

[圖5E]至[圖5F]繪示本發明實施例3的熱擴散度檢測結果之長條圖。

[圖6A]至[圖6C]分別繪示本發明比較例1至3的熱擴散度檢測結果之長條圖。

[圖7A]繪示本發明實施例4和5之第二複合體施加雷射與否的熱擴散度結果之長條圖。

[圖7B]繪示本發明實施例4、實施例6以及比較例4的第二複合體施加雷射與否的熱擴散度結果之長條圖。

[圖8]繪示應用本發明之分析物濃度的檢測方法於淚液樣本的實驗結果。

[圖9A]至[圖9D]繪示本發明之實施例8至11的電腦模擬結果圖。

### 【實施方式】

【0023】 本發明之分析物濃度的檢測方法包含使第一複合體與標準分析物或待測分析物進行競爭反應，以使第一複合體與金屬奈米粒子結合並分別形成控制組之第二複合體和待測組之第三複合體。利用第二複合體和第三複合體的熱擴散度差異，可判斷待測組之待測分析物濃度高於或低於控制組之標準分析物濃度。

【0024】 進一步而言，第二複合體和第三複合體之間的擴散度差異起因於分析物的濃度高低：當分析物濃度高時，金屬奈米粒子與分析物之間的反應強於金屬奈米粒子與第一複合體之間的反應，因此所形成之複合體所接之金屬奈米粒子較少；反之，當分析物濃度低時，金屬奈米粒子與第一複合體之間的反應強於金屬奈米粒子與分析物之間的反應，因此所形成的複合體接上較多的金屬奈米粒子，造成複合體體積變大、熱擴散度降低。此外，本發明之檢測方法進一步利用施加雷射，引發第二複合體和第三複合體上的金屬奈米粒子之表面電漿共振，使其熱擴散效應更顯著，以提高檢測的靈敏度。因此，本發明的分析物濃度的檢測方法具有高偵測靈敏度、低偵測極限、廣動態範圍、操作簡單、具有良好再現性的優點，並可適用於非侵入式地快速篩檢疾病之平台。

【0025】 本發明說明書所稱之結合配偶體(Binding Partner)係指針對特定分析物具有專一性結合力之物質，舉例而言，抗體與抗原、蛋白與其受體，或其他類似的結合關係之物質，可互為彼此的結合配偶體。

【0026】 本發明說明書所稱之熱擴散度係指特定溶液中，經光源激發後可測得之特定物質的布朗運動情形(即擴散情形)，其中物質體積越大，布朗運動情形越不明顯，即後述所稱之熱擴散度小。

【0027】 本發明說明書所稱之二分法係指設定一預設值，並利用熱擴散度之差異判斷待測值為高於或是低於上述

預設值。由於不需利用檢量線進行定量以精準判斷出實際數值，本發明之檢測方法可大幅降低偵測極限、提高偵測靈敏度，並加速檢測時間。

**【0028】** 本發明說明書所稱之高濃度係指高於控制組之分析物濃度；反之，所稱之低濃度係指低於控制組之分析物濃度。

**【0029】** 本發明說明書所稱之金屬奈米粒子的等效粒徑指尚未有結合配偶體修飾之純金屬奈米粒子的尺寸大小。

**【0030】** 以下分別敘述本發明之分析物濃度的檢測方法之各個步驟。

### 1. 提供至少二反應溶液

**【0031】** 本發明此處所稱之反應溶液包含第一複合體。所提供的至少二反應溶液之一者係用以製成控制組的第二複合體，而至少另一者可用以製成待測組的第三複合體，換言之，本發明之檢測方法可同時進行多組樣品之檢測。詳細請容後述。

**【0032】** 以下配合圖1說明形成第一複合體100的步驟流程，圖1根據本發明之一些實施例所述之分析物濃度的檢測方法繪示形成第一複合體100的流程示意圖。在一實施例中，首先，如步驟101所示，將結合配偶體120固定於標記粒子110的表面，其中標記粒子110的表面111可修飾有氨基，圖1的結合配偶體120以抗體做為代表，然也可使用其他物質作為結合配偶體。固定結合配偶體120的方法可例如

使結合配偶體120與標記粒子110之間形成共價鍵結。所述共價鍵結可例如利用碳二亞胺交聯化學法(Carbodiimide Crosslinker Chemistry)，以形成醯胺鍵。

【0033】 接下來，如步驟102所示，將固定於標記粒子110表面上的結合配偶體120與受質130反應，從而可形成第一複合體100。結合配偶體120上所接附的受質130的量取決於反應時間，惟本發明此處並不針對上述反應時間加以限制，僅以同一實驗使用相同反應時間為宜。

【0034】 如圖1所示，第一複合體100包含標記粒子110、固定於標記粒子110之表面的結合配偶體120，以及與結合配偶體120結合的受質130。第一複合體100實質分散於鹽類溶液中，以形成反應溶液(未繪示)。

【0035】 在一實施例中，標記粒子110的材料可包含螢光化合物。在一例子中，標記粒子110的表面可有氨基修飾。在一例子中，標記粒子110的等效粒徑可為100奈米以上。特別說明的是，由於本發明是藉由競爭反應搭配二分法增加偵測靈敏度，且進一步藉由後述之金奈米粒子增加熱擴散度差異，故所使用之標記粒子110的等效粒徑較大，其相對容易取得、具有穩定的性質，且可提供較大的動態範圍。因此，本發明的方法也具有再現性良好、可偵測濃度範圍大、成本低廉且易於操作的優點。

【0036】 在一實施例中，結合配偶體120可包含但不限於抗原、抗體、受體(Receptor)或配體(Ligand)。

【0037】 在一實施例中，受質130可包含但不限於前述

結合配偶體120的抗原之抗體、前述結合配偶體120的抗體之抗原、前述結合配偶體120的受體之配體或前述結合配偶體120的配體之受體。在一實施例中，可使用後述待測分析物的標準品(或稱標準分析物)做為第一複合體100的受質130。換言之，受質130、後述的待測分析物以及標準分析物實質為相同的物質。

**【0038】** 在一實施例中，反應溶液可為進行各種蛋白質反應時常用之緩衝溶液，例如但不限於：磷酸鹽緩衝液(Phosphate Buffered Saline；PBS)、含非離子界面活性劑之磷酸鹽緩衝溶液(Phosphate Buffered Saline Tween 20；PBST)、Tris緩衝液(Tris Buffered Saline；TBS)或其他類似的緩衝溶液等。

## 2. 形成控制組之第二複合體

**【0039】** 以下利用圖2說明形成控制組之第二複合體的流程，圖2根據本發明之一實施例所述之分析物濃度的檢測方法繪示形成第二複合體200的流程示意圖。如圖2之步驟201所示，將具有結合配偶體220之金屬奈米粒子210以及標準分析物230同時加入前述反應溶液之一者中，標準分析物230與圖1所述之第一複合體100進行競爭反應，以形成包含第一複合體100及金奈米粒子210的第二複合體200，其中標準分析物230在前述反應溶液之一者中具有已知濃度。在一實施例中，前述標記粒子110(圖1)的等效粒徑大於金奈米粒子210的等效粒徑。所述已知濃度可根據待測樣

品的情況而做調整，本發明並無特別限制。

【0040】 特別說明的是，倘若金屬奈米粒子210與標準分析物230未同時加入上述反應溶液中，例如先將金屬奈米粒子210與標準分析物230進行反應後才加入，則無法達到競爭反應的效果，從而無法進行分析物濃度的偵測。

【0041】 在一些實施例中，在進行步驟201前，本發明之方法更包含以化學修飾方法，將金屬奈米粒子210修飾上結合配偶體220，上述化學修飾方法可利用市售的套組以及已知的任何修飾方法進行，本發明並無特別限制。

【0042】 所形成的第二複合體200可做為本發明之分析物濃度之檢測方法的控制組，以第二複合體200在反應溶液中的熱擴散度為基準，判斷後述形成之第三複合體300的熱擴散度為大於或小於第二複合體之熱擴散度，從而可判斷待測樣品中待測分析物的濃度。

### 3. 形成待測組之第三複合體

【0043】 以下分別利用圖3A和圖3B說明當待測分析物330濃度高於和低於圖2之標準分析物230時的情況。首先請先參考圖3A，其係繪示形成待測組之第三複合體300A的示意圖，其中待測分析物濃度330高於標準分析物230。如圖3A的步驟301所示，將與前述圖2相同且等量之具有結合配偶體220的金屬奈米粒子210，以及包含待測分析物330之樣本同時加入前述之反應溶液的另一者中，待測分析物330與圖1所述之第一複合體100進行競爭反應，以形成包含第

一複合體100和金奈米粒子210之第三複合體300A。

【0044】 如圖3A所示，由於待測分析物330的濃度較高，其與金屬奈米粒子210之反應強於金屬奈米粒子210與第一複合體100之間的反應，因此大部分的金屬奈米粒子210與待測分析物330結合，而與第一複合體100結合的金屬奈米粒子210較少，從而所形成之第三複合體300A的體積小於圖2所示之第二複合體200的體積。

【0045】 接著請參考圖3B，其係繪示形成待測組之第三複合體300B的示意圖，其中待測分析物濃度330低於標準分析物230。圖3B之步驟303的操作方法與圖3A之步驟301的操作方法相同。如圖3B所示，由於待測分析物330的濃度較低，金屬奈米粒子210與第一複合體100之間的反應強於待測分析物330與金屬奈米粒子210之反應，因此部分的金屬奈米粒子210與第一複合體100結合，從而所形成之第三複合體300B的體積大於圖2所示之第二複合體200的體積。

【0046】 在一實施例中，所述待測分析物330之待測濃度(相當於本發明之檢測方法的偵測極限)可為至少10 pg/ml。

【0047】 在一實施例中，所述金屬奈米粒子210可具有不大於80奈米之等效粒徑。在另一實施例中，所述金屬奈米粒子210的材料包含金。

【0048】 在一實施例中，前述第一複合體100之標記粒子110與金屬奈米粒子210的等效粒徑比可例如為2.5至125，然本發明不限於此。上述等效粒徑比僅以標記粒子110

與金屬奈米粒子210所形成之複合體，可依照不同金屬奈米粒子210的接附量而有熱擴散度的差異即可。然而，需特別說明的是，標記粒子110的等效粒徑越大，會伴隨靈敏度的下降。因此，在一實施例中，標記粒子的等效粒徑較佳為100奈米至5微米。

**【0049】** 在一實施例中，結合配偶體220可包含但不限於抗原、抗體、受體或配體。所述結合配偶體220可與圖1之結合配偶體120相同或不同。在一實施例中，標準分析物230和待測分析物330實質為與前述受質130相同的物質，故此處不另贅述。

**【0050】** 在一實施例中，所述待測分析物330之樣本可包含淚液、血液、尿液、血清或其他生物樣本。

**【0051】** 具體而言，只是要可以親和地、共價地、離子性地或其他物理性或化學性地結合之組合，皆可應用於本發明之標準分析物(或待測分析物)與所使用的結合配偶體。

#### 4. 檢測第二複合體和第三複合體的熱擴散度

**【0052】** 接著，利用光源檢測上述第二複合體和第三複合體在反應溶液中的熱擴散度。具體而言，檢測熱擴散度的步驟主要係利用光源激發第二複合體和第三複合體各自的標記粒子，以獲得其在反應溶液中的布朗運動情形。在一實施例中，上述光源可例如為汞燈、氙燈或金屬鹵化物燈。

**【0053】** 在一實施例中，本發明之檢測方法更包含在以光源照射第二複合體和第三複合體時，對其中的金屬奈米粒

子施加雷射。在一例子中，所述雷射的功率不大於0.23 mW。倘若雷射的功率過大，過多的能量可能影響分析物與結合配偶體之間的結合，或是分析物或結合配偶體本身的構型。在另一例子中，所述雷射的波長範圍可為可見光之波長範圍，例如綠光雷射。

## 5. 進行判斷分析物濃度之步驟

**【0054】** 所述判斷分析物濃度之步驟係指比較前述第二複合體和第三複合體的熱擴散度之差異。

**【0055】** 以下配合圖2、圖3A和圖3B說明第二複合體和第三複合體的熱擴散度的差異原因。

**【0056】** 承上形成第三複合體之過程所述，當待測分析物濃度高於標準分析物濃度時，所得之第三複合體300A之體積小於第二複合體200，因此第三複合體300A的熱擴散度會大於第二複合體200(意即第三複合體300A的布朗運動情形較顯著)。換言之，當所形成之待測組的第三複合體的熱擴散度大於控制組的第二複合體時，代表待測樣品中的待測分析物濃度高於控制組的標準分析物。

**【0057】** 另一方面，在待測分析物濃度330低於標準分析物230的情況中，第三複合體300B的體積大於第二複合體200的體積，因此第三複合體300B的熱擴散度會小於第二複合體200(意即第三複合體300B的布朗運動情形較不顯著)。換言之，當所形成之待測組的第三複合體的熱擴散度小於控制組的第二複合體時，代表待測樣品中的待測分析

物濃度低於控制組的標準分析物。

【0058】 以下利用具體的實施例說明本發明之分析物濃度的檢測方法之進行方式以及優點。

### 實施例1

#### 製備包含第一複合體A-1的反應溶液

【0059】 以 2-嗎啉乙磺酸 (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid ; MES) 清洗2微升( $\mu\text{l}$ )的標記粒子(濃度為 $4.54 \times 10^{12}$ 個/ml)，其中標記粒子為氨基修飾的聚苯乙烯螢光粒子(直徑200奈米；型號：8764，賽默飛世爾(Thermo Fisher)製)，且所述螢光粒子具有放光波長為515奈米的黃綠色螢光。之後，將4  $\mu\text{l}$ 的N-羥基琥珀醯亞胺(N-Hydroxysuccinimide ; NHS ; 濃度為10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )、2  $\mu\text{l}$ 之1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide ; EDC ; 濃度為10 mg/ml)，以及10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之2-嗎啉乙磺酸(pH 5.5)加入10  $\mu\text{l}$ 的單株腫瘤壞死因子之免疫球蛋白G型抗體(anti-TNF- $\alpha$  Immunoglobulin ; 取自小鼠；濃度為0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；後簡稱TNF- $\alpha$ 抗體)中，以活化TNF- $\alpha$ 抗體的羧酸基。接著，於25°C下反應15分鐘後，於含Tween 20之磷酸鹽緩衝液(PBST)中，將標記粒子與活化的TNF- $\alpha$ 抗體混合並於4°C下反應過夜。再來，利用分子篩移除多餘的抗體，並加入1%的小牛血清蛋白(Bovine serum albumin ; BSA)以減少非專一性吸附。然後，以PBST清洗標記粒子

與TNF- $\alpha$ 抗體鍵結之產物，並於其中加入10  $\mu$ l之TNF- $\alpha$ 蛋白(型號為ab9642，abcam製)，在25°C下反應1小時，則可製得包含第一複合體的反應溶液。

### 製備控制組之第二複合體

**【0060】** 在製備第二複合體前，需將純金奈米粒子修飾上結合配偶體。實施例1之結合配偶體係使用多株腫瘤壞死因子之免疫球蛋白G型抗體(取自兔子；型號：ab9635，Abcam製)，而純金奈米粒子具有80奈米之等效粒徑。下述之修飾方法係使用Abcam生產之金結合套組(型號：ab154876)進行。具體而言，將上述多株抗體稀釋至濃度為0.1 mg/ml，再將12  $\mu$ l上述稀釋後的多株抗體添加至42  $\mu$ l的金反應緩衝溶液中並充分混合。接著，將45  $\mu$ l上述混合液加入純金奈米粒子中充分混合並反應20分鐘。接著，加入5  $\mu$ l的反應中止劑，以製得具有多株抗體修飾的金奈米粒子。此金奈米粒子係用於第二複合體以及後述第三複合體之製備。

**【0061】** 於4  $\mu$ l之前述第一複合體之反應溶液中同時加入6  $\mu$ l金奈米粒子(有多株抗體修飾)以及標準分析物(TNF- $\alpha$ 蛋白)，使得反應溶液之金奈米粒子的最終濃度為7.5 OD，且TNF- $\alpha$ 蛋白的最終濃度為10  $\mu$ g/ml，並在25°C下反應1小時後，可製得所述第二複合體。

### 製備第三複合體

**【0062】** 製備第三複合體的方法與製備第二複合體的方

法相同，且實施例1包含四組不同TNF- $\alpha$ 蛋白的最終濃度的第三複合體。實施例1之第三複合體的製備方法係將上述第二複合體之標準分析物取代為含有待測分析物(TNF- $\alpha$ 蛋白)的樣本。本發明實施例1係以標準品之稀釋溶液作為上述樣本。在此實施例中，含有第三複合體的反應溶液中的金奈米粒子的最終濃度為7.5 OD，且四組待測樣品之TNF- $\alpha$ 蛋白的最終濃度分別為1、100、2以及50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

### 檢測第二複合體和第三複合體之熱擴散度

**【0063】** 以下利用圖4說明本發明檢測第二複合體和第三複合體之裝置與方法。圖4係繪示含有第二複合體或第三複合體之樣品的承載裝置400之示意剖面圖。如圖4所示，含有第二複合體(或第三複合體)之樣品401係承載於玻片410上，玻片410的二側設有間隔件420，以提供樣品401的容置空間。間隔件420上方設有另一玻片430，以覆蓋樣品401。玻片410和玻片430朝外之一側可各設有一個磁鐵440，以固定上述承載裝置400。

**【0064】** 接著，以汞燈(型號為U-RFL-T，Olympus製)照射承載裝置400中的樣品401，並同時施加波長為532奈米、功率為0.23 mW之綠光雷射。使用直立式顯微鏡和照相機(型號為FL3-U3-13S2C，Point Grey製)配合電腦軟體，以每秒15畫格的速率拍攝40秒鐘，並經影像疊加以及交越相關分析(cross-correlation)後，可獲得影像的強度峰值。上述影像的強度峰值與第二複合體和第三複合體各自在單位時間內因布朗運動所產生的位移(以Evaluation

software for Digital Particle Image Velocimetry(EDPIV)之軟體進行計算)相關，而上述位移即代表本發明所稱之熱擴散度。實施例1之結果如圖5A和圖5B所示。關於本發明之熱擴散度的具體計算方式，請參考台灣申請號TW 105100716一案。

### **實施例2至3以及比較例1至3**

**【0065】** 實施例2至3以及比較例1至3係使用與實施例1相同之方法進行，不同的是，實施例2至3以及比較例1至3改變標準分析物及/或待測分析物之最終濃度，以測試分析物濃度之檢測方法的偵測靈敏度以及偵測極限。具體的製程條件悉如表1所示，此處不另贅述。實施例2之結果如圖5C至圖5D所示，且實施例3之結果如圖5E至圖5F所示。比較例1至3之結果分別如圖6A至圖6C所示。

### **實施例4**

**【0066】** 實施例4是單用第二複合體來檢視施加雷射對於熱擴散度之影響。實施例4使用TNF- $\alpha$ 蛋白濃度為1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的第二複合體來進行，其製備方法與實施例1相同，此處不另贅述。然後，利用如實施例1所示之檢測第二複合體的熱擴散度的方法，檢測施加及不施加綠光雷射時，第二複合體之熱擴散度的差異。實施例4之結果悉如圖7A所示。

### **實施例5**

**【0067】** 實施例5使用與實施例4相同的方法進行，不同的是，實施例5係使用實施例2之第二複合體(TNF- $\alpha$ 蛋白濃

度為1 ng/ml)。實施例5之結果悉如圖7A所示。

### 實施例6

【0068】 實施例6使用與實施例4相同的方式，但實施例6係使用實施例3之第二複合體，並將其所使用之金奈米粒子等效粒徑改變為40奈米。實施例6之結果悉如圖7B所示。

### 實施例7

【0069】 實施例7以與實施例1相同的方式進行，不同的是，實施例7做為標準分析物之TNF- $\alpha$ 蛋白的濃度為10 pg/ml，而實施例7之待測分析物分別為三位受試者之淚液樣本12.5  $\mu$ l，其結果如圖8所示。

### 實施例8

【0070】 實施例8以電腦軟體模擬使用100奈米之標記粒子(聚苯乙烯螢光粒子)與40奈米之金奈米粒子，形成如上述之第二複合體時，隨標記粒子上所附接的金奈米粒子的數量變化而產生的熱擴散度之變化情形。所述電腦模擬是依照下述數學式進行運算，其簡述如下：首先，使用式(1)計算金奈米粒子接附於標記粒子上的數量；接著，使用式(2)及上述數量換算得到接附有金奈米粒子之標記粒子(即第二複合體)的體積；然後，使用式(3)計算第二複合體的有效半徑；接下來，使用式(4)計算第二複合體在常溫下的熱擴散度。實施例8之電腦模擬結果如圖9A所示。

$$N = \frac{4\pi R^2}{\pi r^2} \quad \text{式(1)}$$

$$V = \frac{4}{3}\pi R^3 + N \frac{4}{3}\pi r^3 \quad \text{式(2)}$$

$$d_p = \sqrt[3]{\frac{6V}{\pi}} \quad \text{式(3)}$$

$$D = \frac{K_b T}{3\pi\eta d_p} \quad \text{式(4)}$$

於式(1)至式(4)中，R為標記粒子半徑，r為金奈米粒子半徑，N為單一標記粒子所接附的金奈米粒子數量，V為第二複合體的體積， $d_p$ 為有效半徑， $K_b$ 為波茲曼常數， $\eta$ 為水的黏度，T為溫度(此處以25°C計)。

### 實施例9至11

【0071】 實施例9至11係與實施例8以相同的方式進行，不同的是，實施例9至11改變標記粒子及/或金奈米粒子的等效粒徑，其中實施例9使用200奈米的標記粒子和80奈米的金奈米粒子，實施例10使用5微米的標記粒子和40奈米的金奈米粒子，而實施例11使用5微米的標記粒子和80奈米的金奈米粒子。實施例9至11的結果如圖9B至圖9D所示。

### 比較例4

【0072】 比較例4係使用與實施例4相同的方式來進行，但比較例4係使用實施例1之第一複合體進行施加雷射與否對熱擴散度之影響的測試。比較例4之結果悉如圖7B所示。

【0073】 特別說明的是，本發明圖5A至圖7B中的「\*」代表 $p < 0.05$ ，「\*\*」代表 $p < 0.01$ ，及「\*\*\*」代表 $p < 0.001$ 。

【0074】 請先參考圖5A至圖5F，其繪示本發明實施例1

至3的熱擴散度檢測結果之長條圖。如圖所示，在TNF- $\alpha$ 蛋白標準分析物的濃度分別為10  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\text{ng/ml}$ 以及10  $\text{pg/ml}$ 的實施例1至3中，分別可檢測與標準分析物濃度差為5倍至10倍的樣品(例如圖5A繪示使用10  $\mu\text{g/ml}$ 的標準分析物，可檢測10倍濃度差的1  $\mu\text{g/ml}$ 和100  $\mu\text{g/ml}$ 的待測分析物之例子)。在上述實施例中，標準分析物與待測分析物的熱擴散度有顯著差異。顯然地，利用本發明之檢測方法，偵測極限可達至少10  $\text{pg/ml}$ 以上，且可達到較大的動態範圍。

**【0075】** 另一方面，請參考圖6A至圖6C，其繪示本發明比較例1至3的熱擴散度檢測結果之長條圖。如圖所示，在TNF- $\alpha$ 蛋白標準分析物的濃度分別為10  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\text{ng/ml}$ 以及10  $\text{pg/ml}$ 的比較例1至3中，當標準分析物與待測分析物的濃度差為2倍時，其結果較為不穩定，因此本發明之標準分析物與待測分析物之濃度差較佳為大於2倍。

**【0076】** 接下來請參考圖7A，其係繪示本發明實施例4和5之第二複合體施加雷射與否的熱擴散度結果之長條圖。如圖所示，實施例4(TNF- $\alpha$ 蛋白濃度為1  $\mu\text{g/ml}$ )和實施例5(TNF- $\alpha$ 蛋白濃度為1  $\text{ng/ml}$ )在施加雷射後，對於第二複合體之熱擴散度皆顯著性地增加，代表施加雷射可增加具有金奈米粒子(等效粒徑為80奈米)之複合體的震動，從而可增加本發明之分析物濃度之檢測方法的靈敏度。

**【0077】** 請參考圖7B，其係繪示本發明實施例4、實施例6以及比較例4的第二複合體施加雷射與否的熱擴散度結

果之長條圖。如圖所示，在具有相同濃度(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )之TNF- $\alpha$ 蛋白的第二複合體中，具有40奈米之金奈米粒子(實施例6)的第二複合體在施加雷射前後的熱擴散度差異顯著，其是因為40奈米之金奈米粒子符合所施加的雷射之波長，因而可產生顯著之表面電漿共振效應之故。而實施例4之80奈米的金奈米粒子對於雷射有無的熱擴散度差異相對較不明顯但仍有差異。另一方面，比較例4之未有金奈米粒子的第一複合體雖然在統計上仍有顯著性差異，其是因為施予雷射會使粒子產生熱泳的效應所致，然而根據圖7B也可了解，相較於具有40奈米之金奈米粒子的第二複合體，比較例4之未有金奈米粒子的第一複合體施加雷射與否之熱擴散度差異不大。

**【0078】** 接著請參考圖8，其係繪示應用本發明之分析物濃度的檢測方法於淚液樣本的實驗結果。如圖8所示，可藉由前述所說明的二分法定義標準線(10  $\text{pg}/\text{ml}$ )，檢測樣本中的特定物質之濃度是否高於或低於標準線。因此，可快速篩檢出圖8之三個樣本(分別進行5重複)均低於標準線。據此，可將本發明之檢測方法應用於臨床之疾病快速篩檢上。

**【0079】** 請參考圖9A至圖9D，其分別繪示實施例8至11之電腦模擬結果圖。從圖9A至圖9D可知，接合不大於80奈米之金奈米粒子與100奈米以上(例如100奈米至5微米)之標記粒子所形成之第二複合體，對應不同接附量的金奈米粒子都可具有熱擴散度的差異。此外，舉例而言，以顯微鏡使用100倍物鏡，CCD解析度為10  $\mu\text{m}/\text{pix}$ 的狀況而言，整體

解析度可達 $10^{-16}$ 。因此，圖9A至圖9D的熱擴散度確實可使用目前已知的設備觀察。據此，本發明之分析物濃度的檢測方法至少可適用100奈米至5微米的標記粒子與不大於80奈米之金奈米粒子的組合。

**【0080】** 本發明之分析物濃度的檢測方法利用競爭反應分別製得的標準分析物之控制組以及待測分析物的待測組，比較上述二組的熱擴散度差異，因而可簡單利用二分法得知待測分析物的濃度高於或低於標準分析物，故可具有較低的偵測極限。上述方法利用金屬奈米粒子增加所得之複合體的熱擴散度差異，並可進一步利用雷射造成金屬奈米粒子的表面電漿共振，從而更提高本發明之檢測方法的偵測靈敏度。此外，本發明之標記粒子的等效粒徑限制較少，本發明之檢測方法的標準分析物可重複使用，並同時用於檢測多組待測分析物。本發明之檢測方法具有高偵測靈敏度、低偵測極限、廣動態範圍、操作簡單、快速、良好再現性及低成本等優點，適用於非侵入式的疾病篩檢。

**【0081】** 雖然本發明已以數個實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，在本發明所屬技術領域中任何具有通常知識者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

### **【符號說明】**

**【0082】**

- 100：第一複合體
- 101、102、201、301、303：步驟
- 110：標記粒子
- 111：表面
- 120、220：結合配偶體
- 130：受質
- 200：第二複合體
- 210：金屬奈米粒子
- 230：標準分析物
- 300A、300bB：第三複合體
- 330：待測分析物
- 400：承載裝置
- 401：樣品
- 410、430：玻片
- 420：間隔件
- 440：磁鐵

表 1

	實施例												比較例																			
	1			2			3			1			2			3																
第一複合體	標記粒子等效粒徑(nm)			200			200			200			200			200																
	受質(TNF- $\alpha$ )濃度( $\mu$ g/ml)			10 <sup>3</sup>			1			10 <sup>2</sup>			10 <sup>4</sup>			1																
第二複合體	金奈米粒子等效粒徑(nm)			80			80			80			80			80																
	標準分析物(TNF- $\alpha$ )濃度( $\mu$ g/ml)			10			10 <sup>3</sup>			10 <sup>5</sup>			10			10 <sup>3</sup>																
第三複合體	金奈米粒子等效粒徑(nm)			80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80															
	待測分析物(TNF- $\alpha$ )濃度( $\mu$ g/ml)			1	100	2	50	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	2 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	2 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	2 $\times$ 10 <sup>-6</sup>	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup>	5 $\times$ 10 <sup>-3</sup>														
是否施加綠光雷射																		O			O			O								
標記粒子/金奈米粒子之等效粒徑比																		2.5			2.5			2.5			2.5			2.5		

【中文發明名稱】 分析物濃度的檢測方法

【英文發明名稱】 DETECTION METHOD FOR  
DETECTING ANALYTE CONCENTRATION

## 【中文】

本發明之分析物濃度的檢測方法包含使第一複合體與標準分析物或待測分析物進行競爭反應，以使第一複合體與金屬奈米粒子結合並分別形成控制組之第二複合體和待測組之第三複合體。利用第二複合體和第三複合體的熱擴散度差異，可判斷待測組之待測分析物濃度高於或低於控制組之標準分析物濃度。

## 【英文】

A detection method for detecting an analyte concentration of the present invention includes performing a competitive reaction between a first complex and a standard analyte or an analyte to be measured, so that the first complex may combine with a metal nanoparticle, and a second complex of a control group and a third complex of a measured group are respectively formed. Then, a difference of heat diffusivity of the second complex and the third complex may determine an analyte concentration of

the measured group is higher or lower than a pre-determined analyte concentration of the control group.

【指定代表圖】圖3A

【代表圖之符號簡單說明】

100：第一複合體

210：金屬奈米粒子

220：結合配偶體

300A：第三複合體

301：步驟

330：待測分析物

【特徵化學式】(無)

## 【發明申請專利範圍】

【第 1 項】一種分析物濃度的檢測方法，包含：

提供至少二反應溶液，其中該至少二反應溶液的每一者包含一第一複合體，且該第一複合體包含：

一標記粒子；

一結合配偶體，固定於該標記粒子之一表面；以及

一受質，與該結合配偶體結合；

於該至少二反應溶液之一者中，同時加入一標準分析物以及一金屬奈米粒子，以形成一第二複合體，其中該金屬奈米粒子具有該結合配偶體，且該標準分析物於該至少二反應溶液之該者中具有一已知濃度；

於該至少二反應溶液之另一者中，同時加入包含一待測分析物之一樣本以及該金屬奈米粒子，以形成一第三複合體，其中該待測分析物於該至少二反應溶液之該另一者中具有一待測濃度，該標記粒子之一等效粒徑大於該金屬奈米粒子之一等效粒徑，且該受質、該標準分析物以及該待測分析物實質為相同物質；以及

利用一光源檢測該第二複合體之一第一熱擴散度和該第三複合體之一第二熱擴散度；以及

進行一判斷分析物濃度之步驟，其中當該第一熱擴散度小於該第二熱擴散度時，判斷該待測濃度大於該已知濃度；或，當該第一熱擴散度大於該第二熱擴散度時，判斷該待測濃度小於該已知濃度。

【第 2 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度

的檢測方法，其中利用該光源檢測該第一熱擴散度和該第二熱擴散度時，更包含對該金屬奈米粒子施加一雷射。

【第 3 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該金屬奈米粒子具有不大於 80 奈米之該等效粒徑。

【第 4 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該標記粒子具有 100 奈米以上之一等效粒徑。

【第 5 項】如申請專利範圍第 4 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該標記粒子和該金屬奈米粒子的一等效粒徑比可為 2.5 至 125。

【第 6 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該金屬奈米粒子之一材料包含金。

【第 7 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該標記粒子之一材料包含螢光化合物。

【第 8 項】如申請專利範圍第 2 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該雷射之一功率不大於 0.23 mW。

【第 9 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度

的檢測方法，其中該樣本包含淚液、血液、尿液、血清或其他生物樣本。

【第 10 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該待測濃度為至少 10 pg/ml。

【第 11 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該光源激發該第二複合體和該第三複合體各自之該標記粒子。

【第 12 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該光源包含汞燈、氙燈或金屬鹵化物燈。

【第 13 項】如申請專利範圍第 1 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該結合配偶體包含一抗原、一抗體、一受體或一配體。

【第 14 項】如申請專利範圍第 13 項所述之分析物濃度的檢測方法，其中該受質、該標準分析物和該待測分析物分別包含該結合配偶體的該抗原之一抗體、該結合配偶體的該抗體之一抗原、該結合配偶體的該受體之一配體，或該結合配偶體的該配體之一受體。

圖式

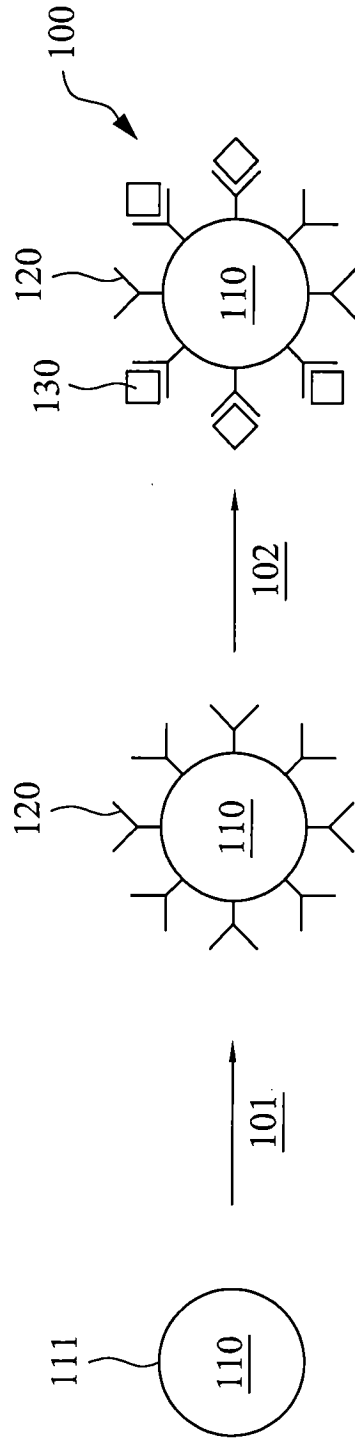


圖 1

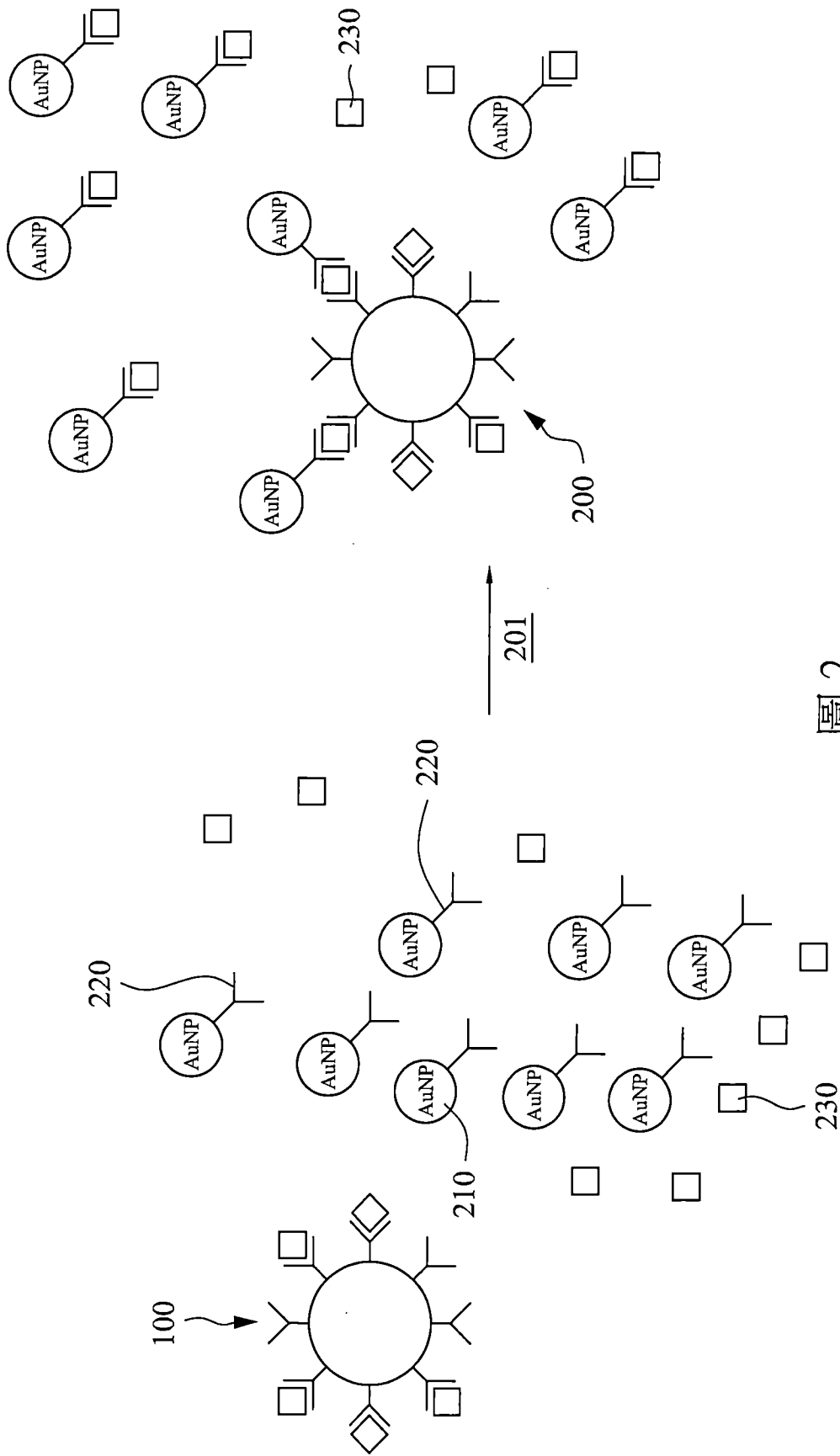


圖 2

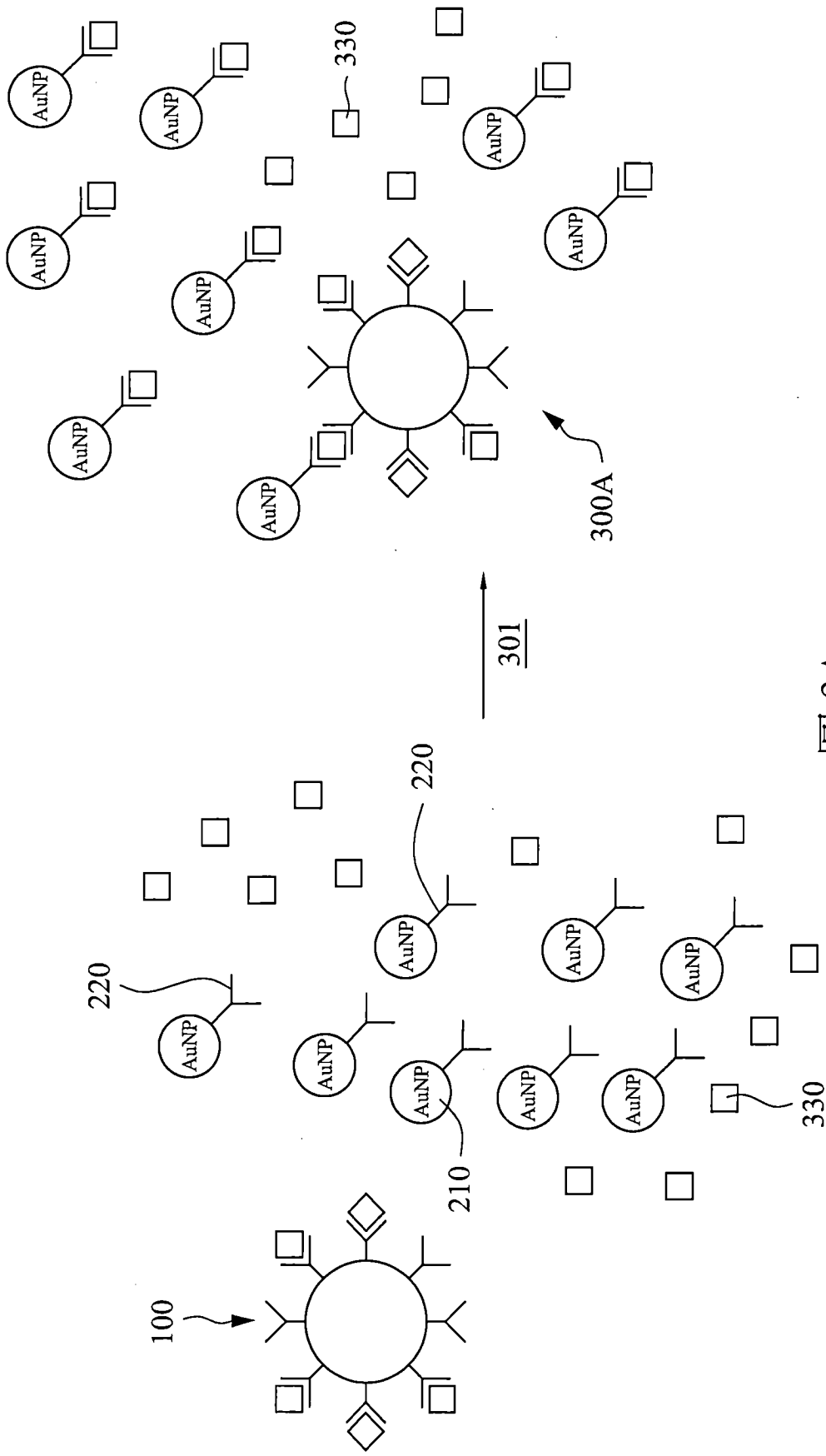


圖 3A

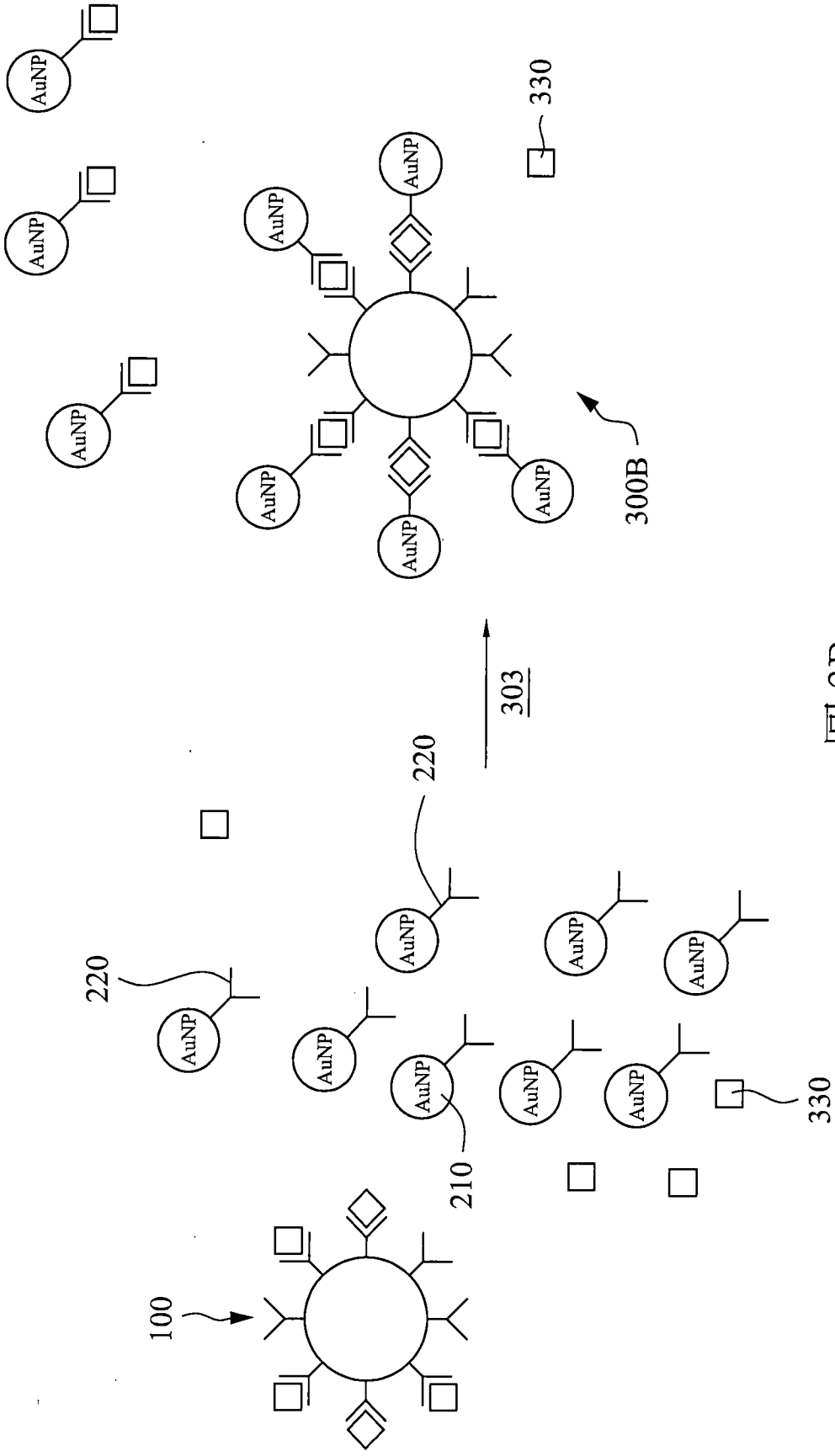


圖 3B

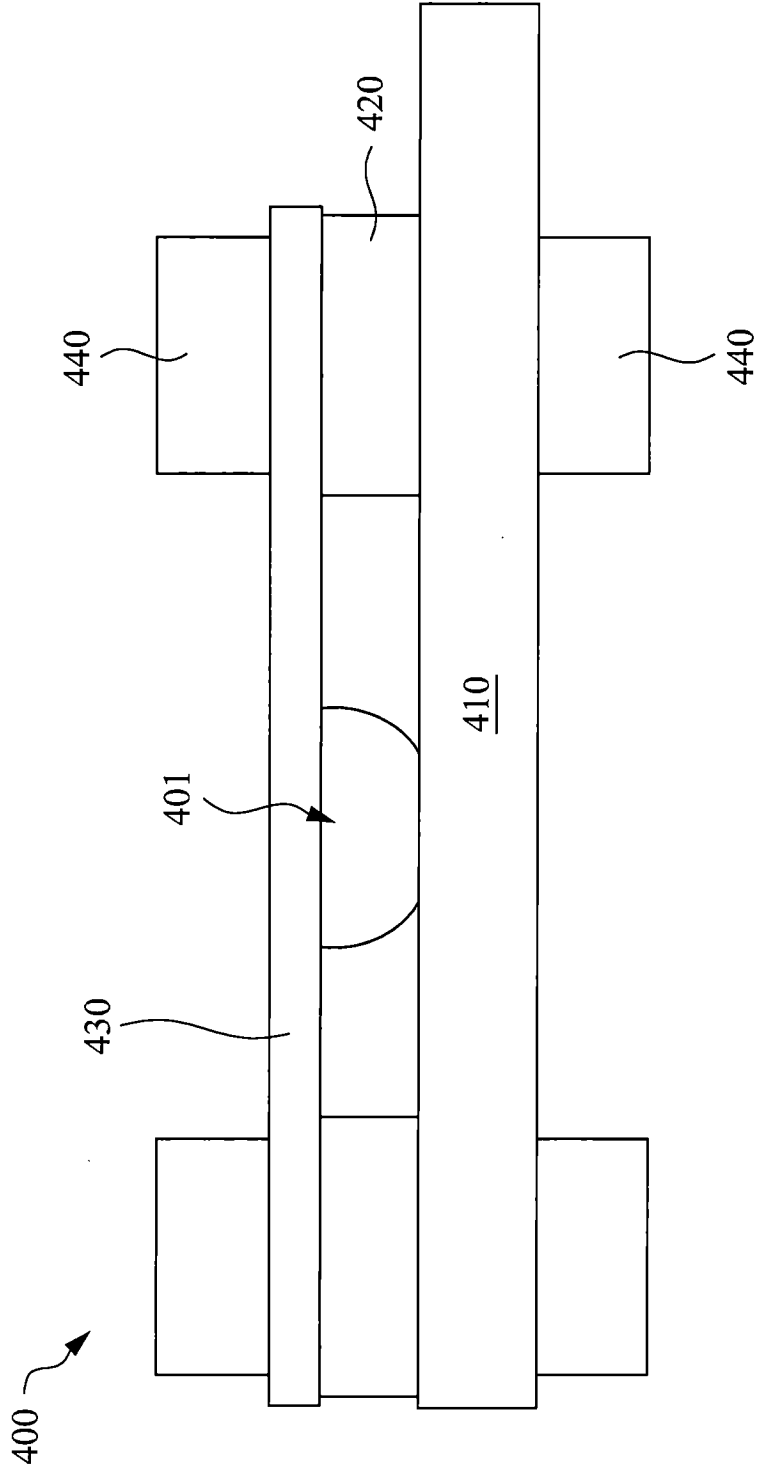


圖 4

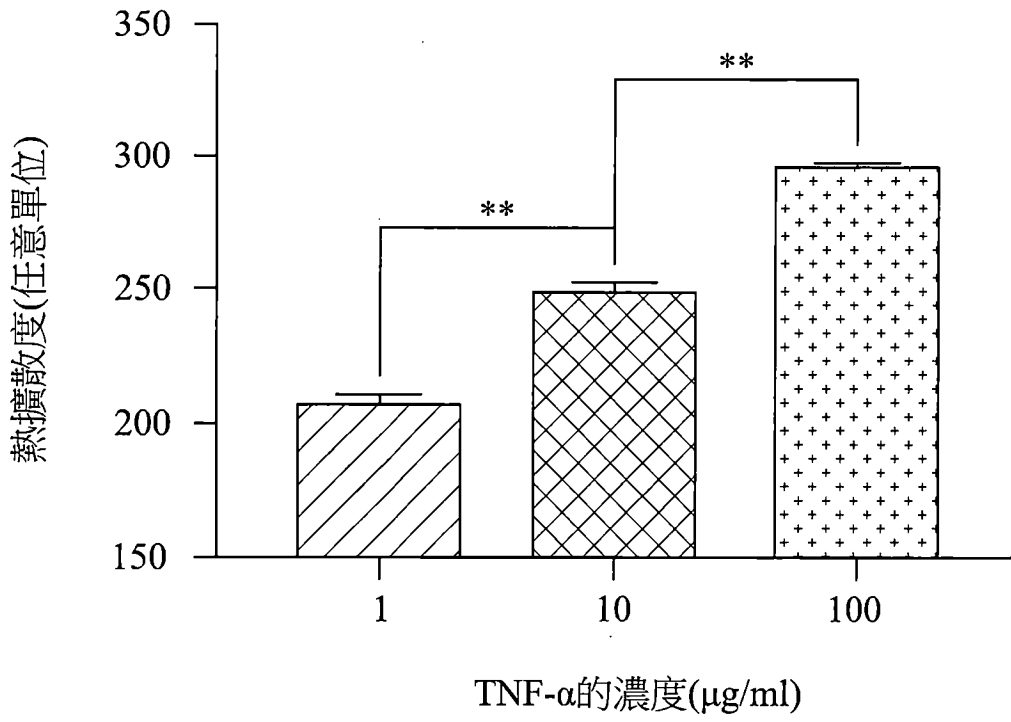


圖 5A

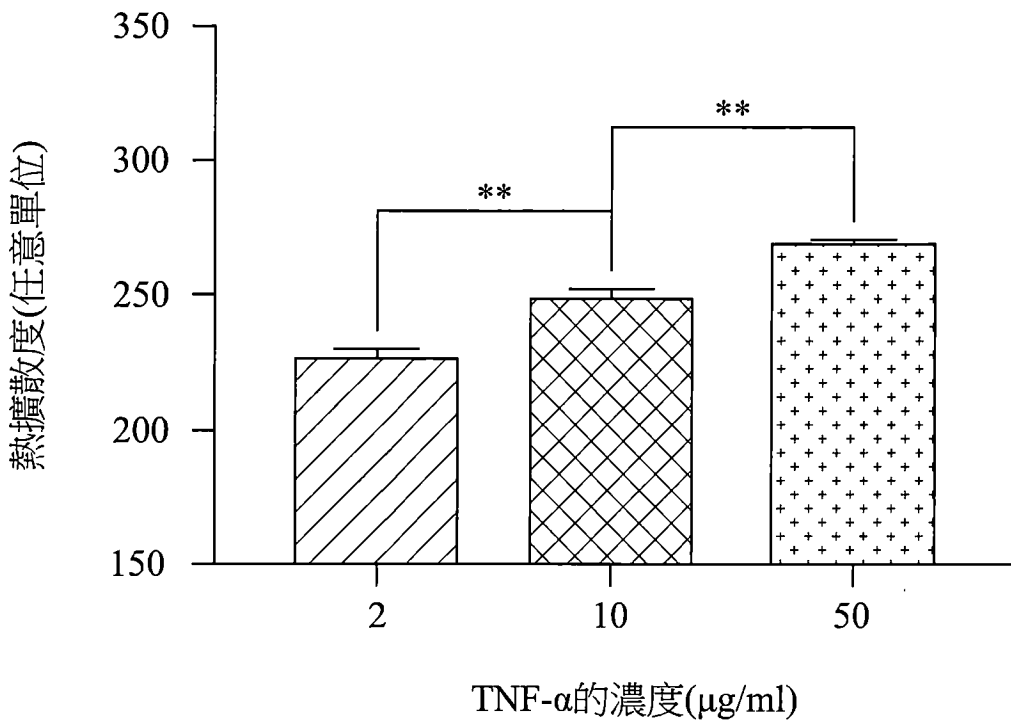


圖 5B

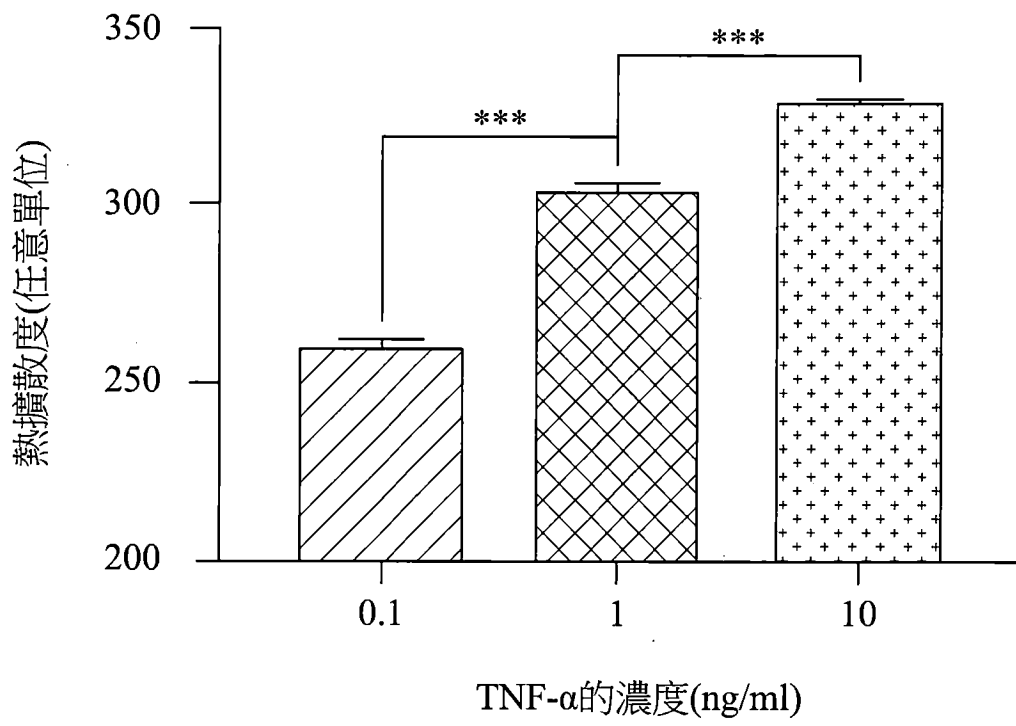


圖 5C

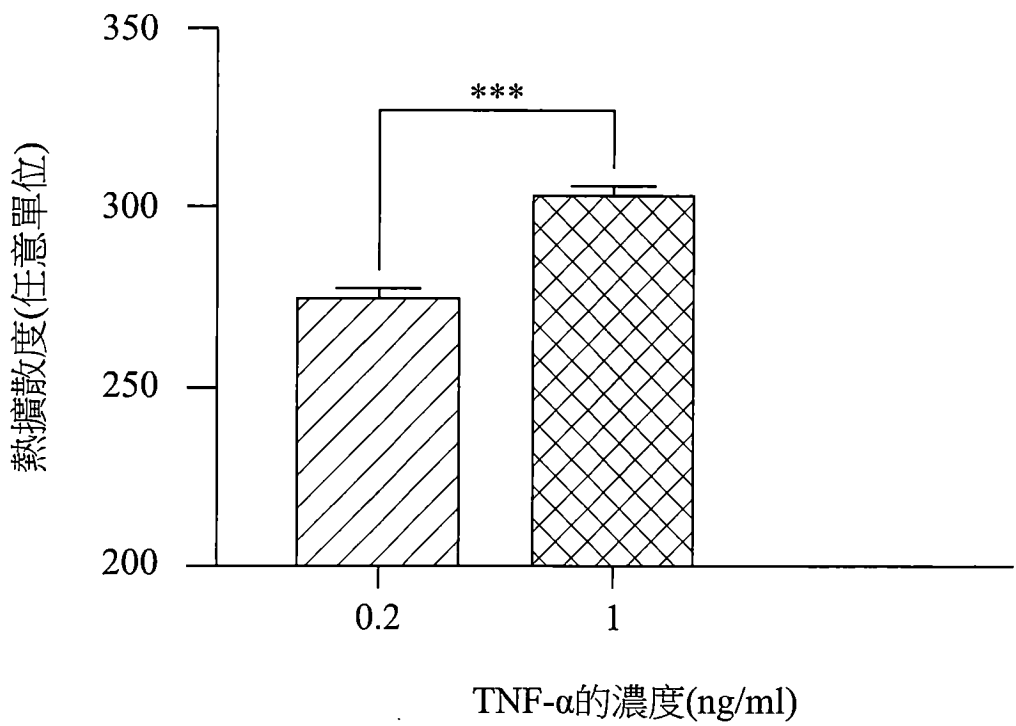


圖 5D

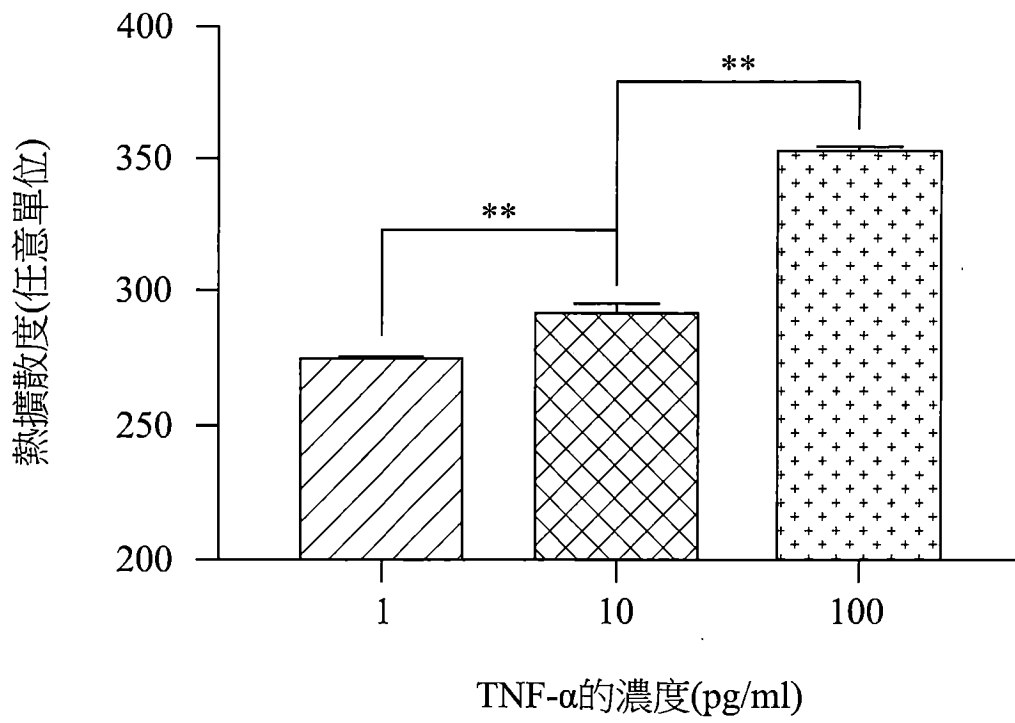


圖 5E

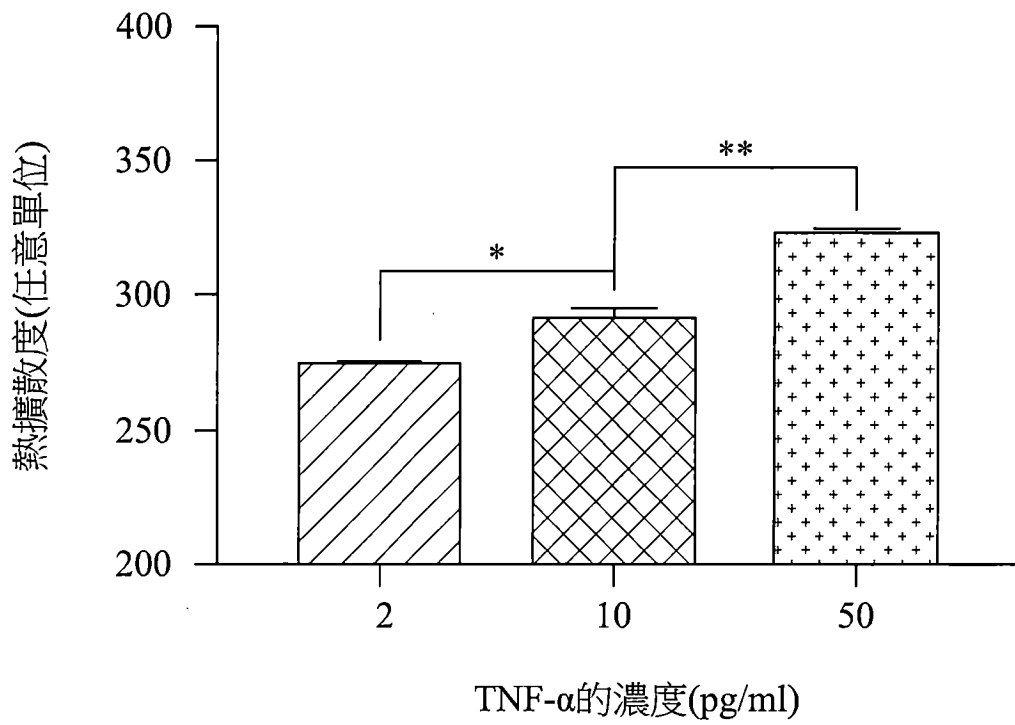


圖 5F

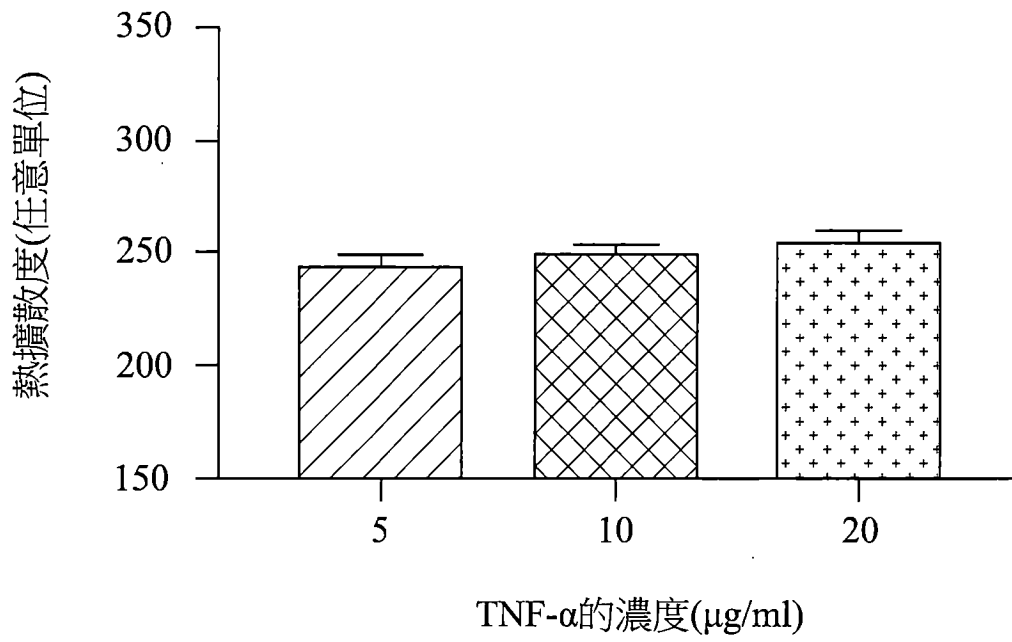


圖 6A

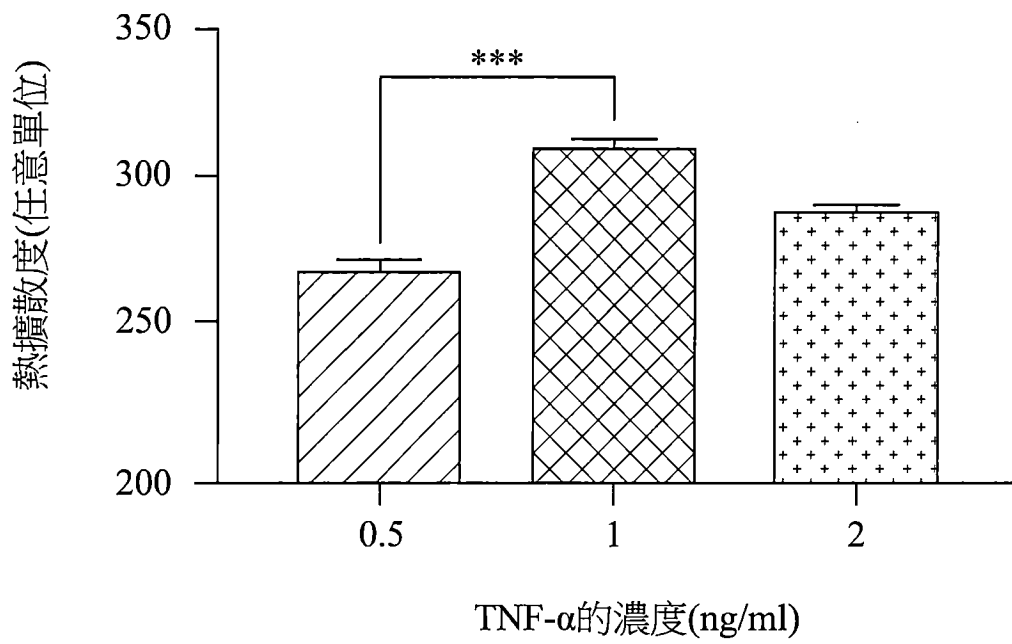


圖 6B

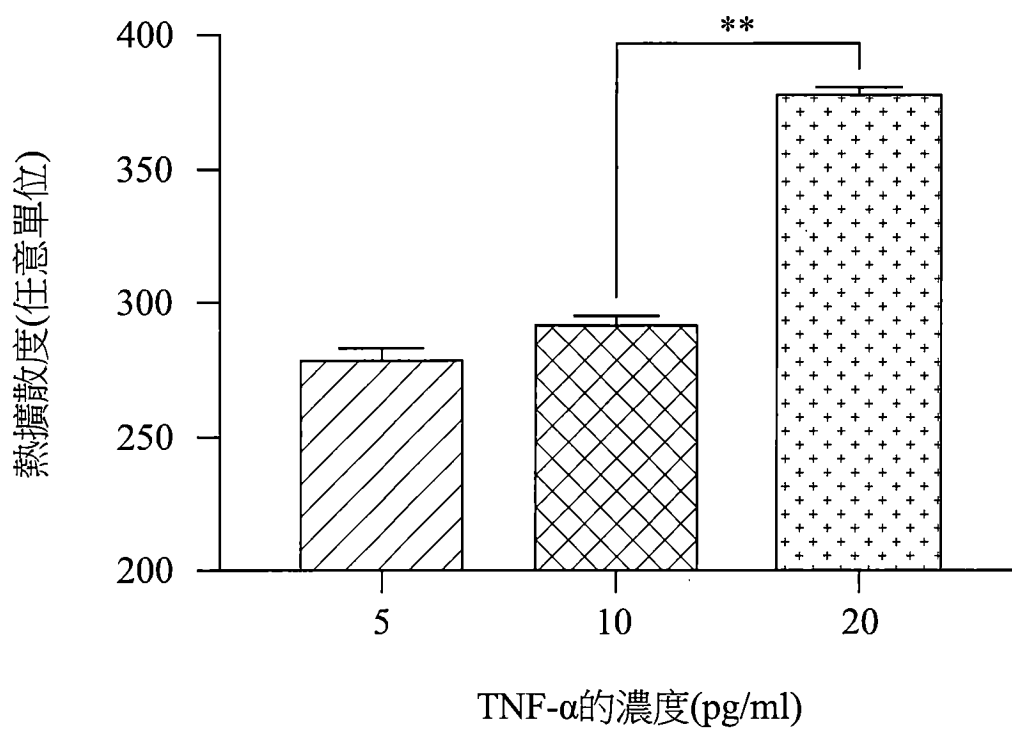


圖 6C

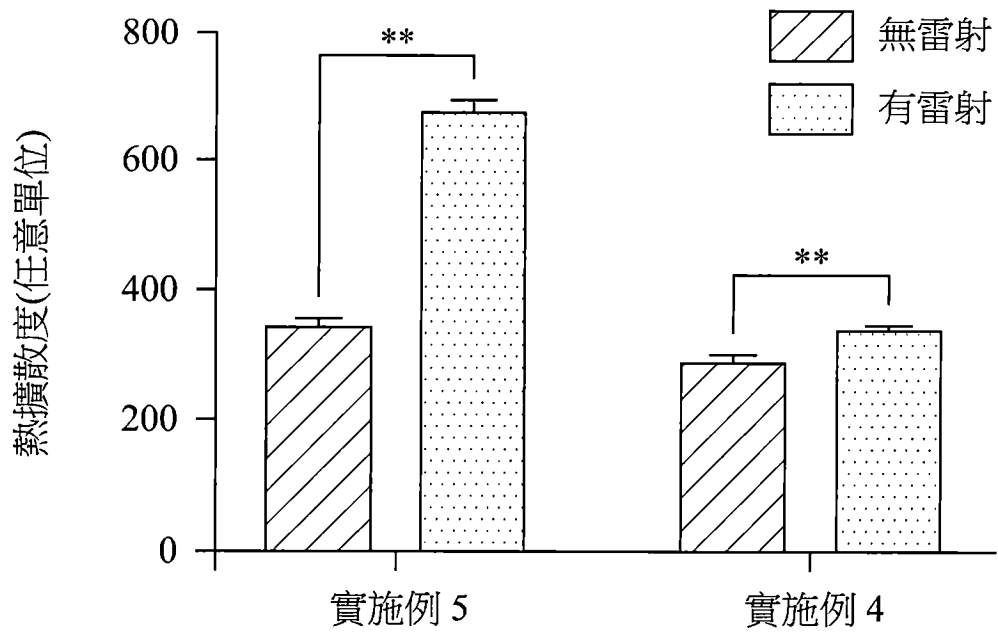


圖 7A

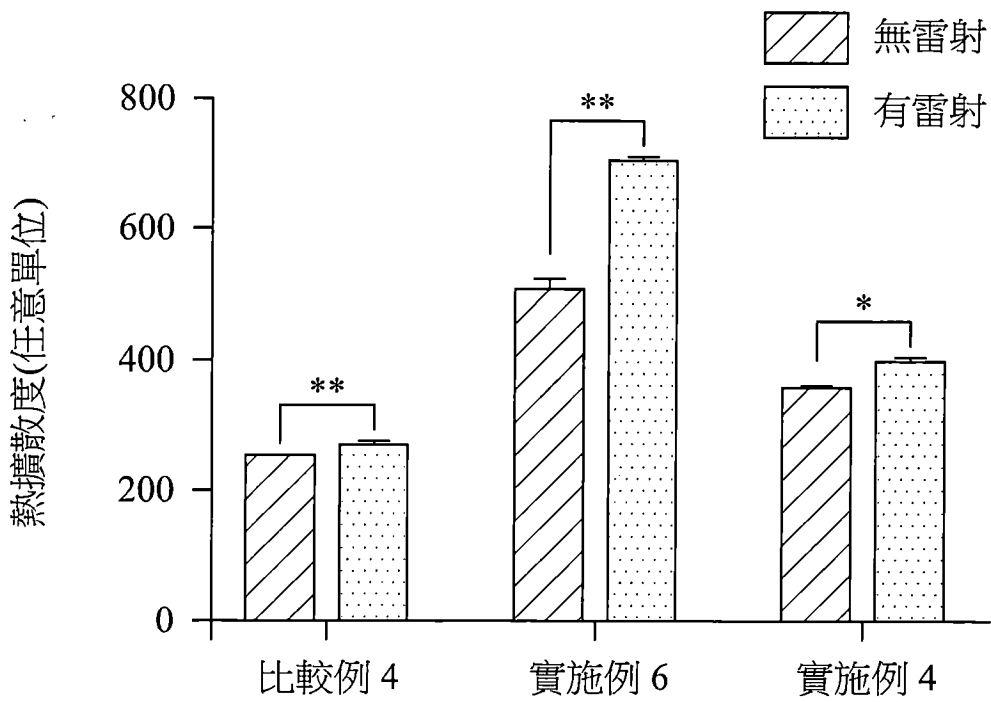


圖 7B

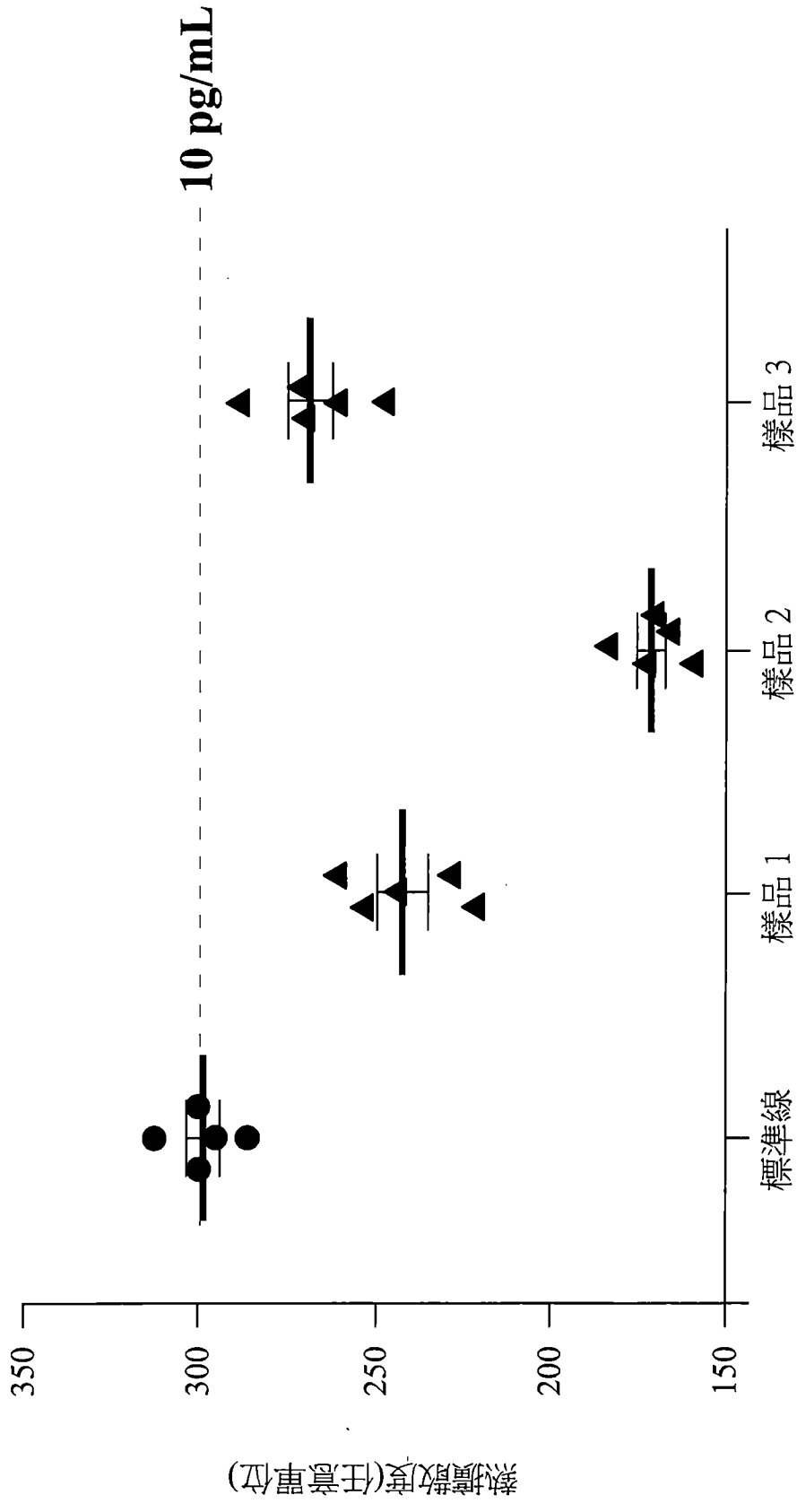


圖 8

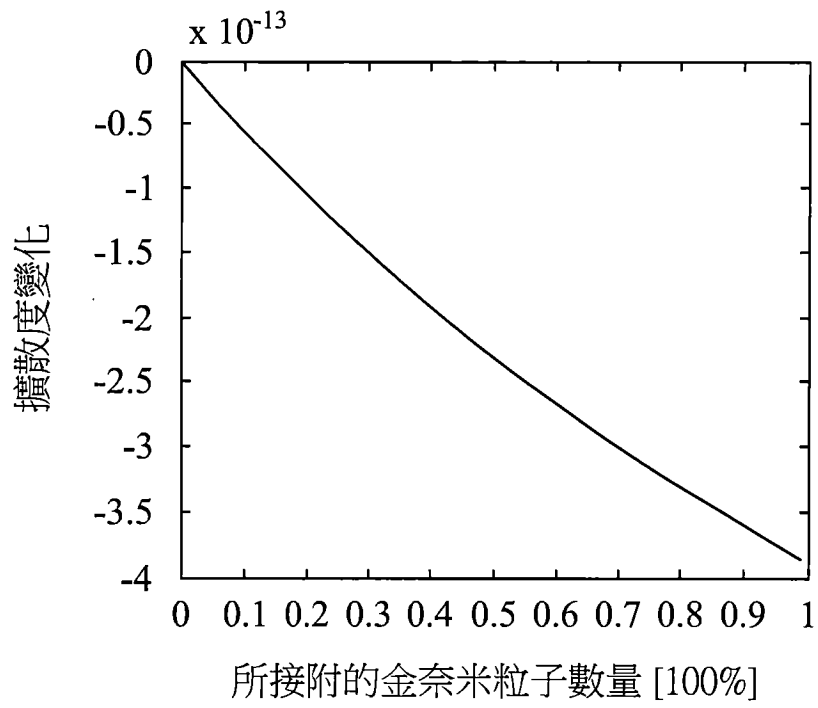


圖 9A

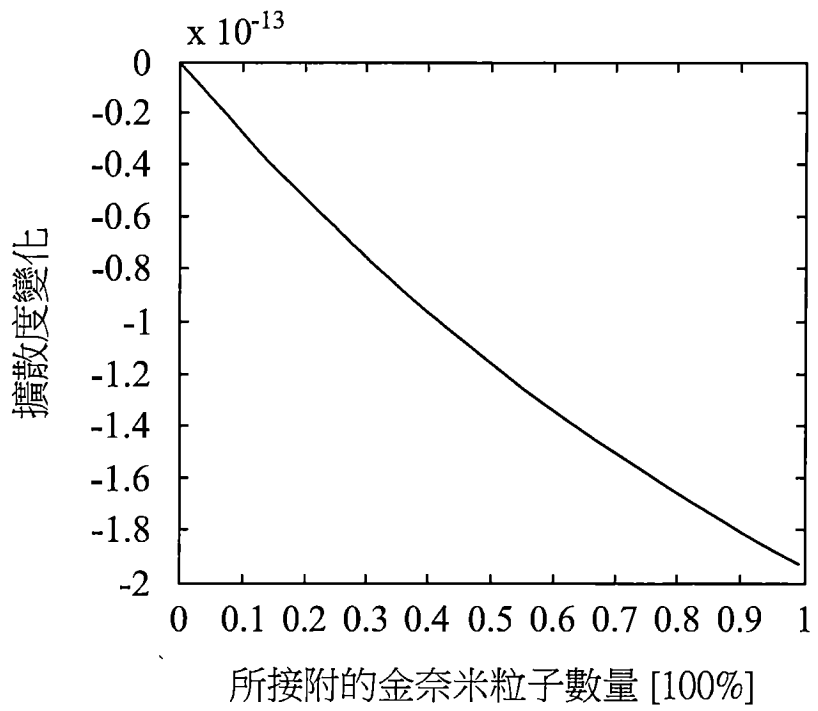


圖 9B

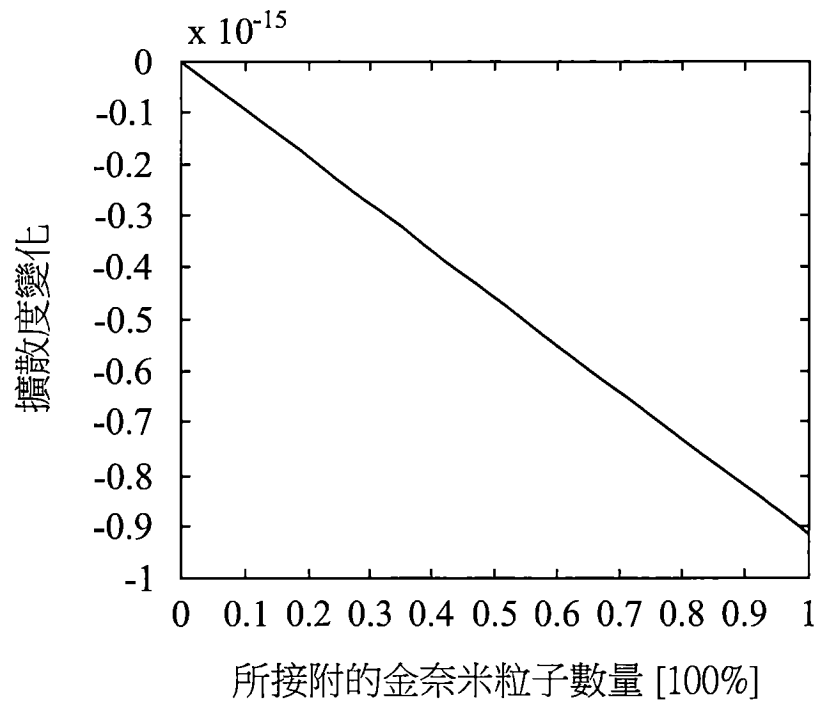


圖 9C

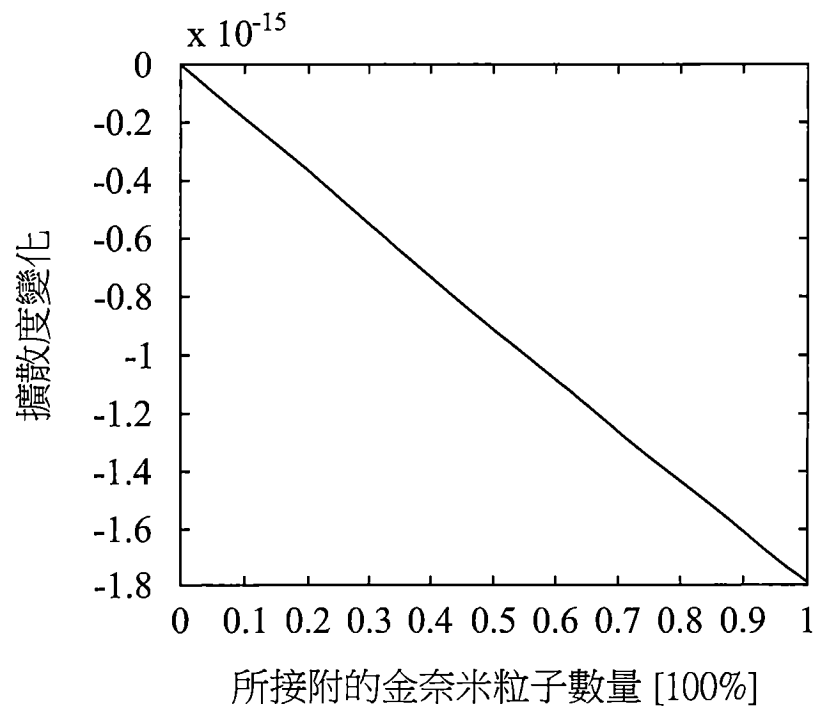


圖 9D