



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 200946913 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：098111807

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 04 月 09 日

(51)Int. Cl. : *G01N33/68 (2006.01)*

G01N33/569 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2008/04/09 美國 61/071,035

(71)申請人：必帝股份有限公司 (美國) BECTON, DICKINSON AND COMPANY (US)
美國

(72)發明人：威德麥爾 克利斯汀 WEIDEMAIER, KRISTIN (US)；山德曼 克里斯坦
SANDMANN, CHRISTIAN (DE)；芙拉萃 羅伯特 A FULCHER, ROBERT A.
(US)；黑田 美樂蒂 KURODA, MELODY (US)；艾爾芬 勞瑞 P ALLPHIN, LORI
PEDERSON (US)；克里 亞當 C CURRY, ADAM C. (US)

(74)代理人：憚軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：116 項 圖式數：2 共 60 頁

(54)名稱

使用經塗覆奈米顆粒之敏感性免疫分析法

SENSITIVE IMMUNOASSAYS USING COATED NANOPARTICLES

(57)摘要

係提供一種經塗覆之奈米顆粒，包含一核心，由一可增加奈米顆粒反射度之外殼環繞，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一具拉曼(Raman)光譜活性分子。亦提供一種使用該經塗覆奈米顆粒之測試裝置與免疫試驗方法。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 200946913 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：098111807

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 04 月 09 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/68 (2006.01)**

G01N33/569 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2008/04/09 美國 61/071,035

(71)申請人：必帝股份有限公司 (美國) BECTON, DICKINSON AND COMPANY (US)
美國

(72)發明人：威德麥爾 克利斯汀 WEIDEMAIER, KRISTIN (US)；山德曼 克里斯坦
SANDMANN, CHRISTIAN (DE)；芙拉萃 羅伯特 A FULCHER, ROBERT A.
(US)；黑田 美樂蒂 KURODA, MELODY (US)；艾爾芬 勞瑞 P ALLPHIN, LORI
PEDERSON (US)；克里 亞當 C CURRY, ADAM C. (US)

(74)代理人：憚軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：116 項 圖式數：2 共 60 頁

(54)名稱

使用經塗覆奈米顆粒之敏感性免疫分析法

SENSITIVE IMMUNOASSAYS USING COATED NANOPARTICLES

(57)摘要

係提供一種經塗覆之奈米顆粒，包含一核心，由一可增加奈米顆粒反射度之外殼環繞，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一具拉曼(Raman)光譜活性分子。亦提供一種使用該經塗覆奈米顆粒之測試裝置與免疫試驗方法。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

相關申請案

本申請案係主張美國臨時申請案號61/071,035，於2008年4月9日提申，在此併入本案以作為參考資料。

發明領域

係提供一種經塗覆之奈米顆粒，包含一核心，由一可增加奈米顆粒反射度之外殼環繞，其中該經塗覆之奈米顆粒不需要，但可選擇性地包括一具拉曼(Raman)光譜活性分子。於此揭示之經塗覆奈米顆粒係用於定量及/或定性測試裝置，測定液體樣本中是否存在有分析物。

【先前技術】

發明背景

免疫分析技術係提供一簡單與相對快速之方法，測定生物樣本中分析物之存在與否。由免疫分析診斷測試提供之資訊通常對於病患照顧相當重要。一般進行試驗以定性或定量偵測特定分析物，例如，當病患罹患特定疾病或症狀時會出現之抗體。此領域中使用之免疫試驗法有很多種，包括用於疾病如細菌或病毒感染，或症狀如懷孕，之試驗方法。

各種形式之免疫試驗法為此技術領域習知。其中一種免疫試驗流程為橫向流動免疫試驗。橫向流動試驗法係利用一固體支撐物，如硝基纖維素膜、塑膠或玻璃，以進行分析物偵測。在“流式”試驗中，取代由支撐物上垂直吸取

樣本，樣本可沿著支撐物側邊流動，藉由毛細作用與其他力量，由施加區域流至表面上之反應區。在橫向流動試驗中，捕捉用抗體係條狀塗覆於固體支撐物上。偵測用抗體則結合有偵測分子，其提供一可偵測訊號。液體樣本係設置為與偵測用抗體接觸，該樣本/偵測抗體混合物可沿著固體支撐物流動。若該分析物存在，在固體支撐物之捕捉用抗體塗覆位置上，便會形成“夾層”錯合物。位於捕捉線上偵測分子之訊號之後會被偵測到，不論是用視覺或儀器判別。橫向流動試驗法可設置為偵測蛋白質、核酸、代謝物、細胞、小分子或其他有興趣之分析物。

另一免疫試驗形式為流式免疫試驗。流式免疫試驗一般係使用一孔狀材料，其上具有或結合有一含試劑之基質層。測試樣本係施加並流至孔狀材料上，樣本中之分析物會與試劑反應，於孔狀材料上產生可偵測之訊號。這些裝置一般包覆於塑膠外罩內，或附有校正器，以幫助特定分析物之偵測。

可用於橫向免疫試驗之許多不同種類之偵測分子為技術上已知，如螢光發光團、金膠體溶液、經標記乳膠顆粒，以及奈米顆粒如量子點(quantum dot)，或表面強化拉曼(Raman)散射(“SERS”)奈米顆粒。例如，美國專利號5,591,645，描述使用目視“追蹤”分子，如膠體金，其可目視而不需儀器。此外，美國專利號6,514,767，Natan揭示SERS-活性複合物奈米顆粒(SACNs)，其包含一金屬奈米顆粒，其表面聯結或結合有一或多種拉曼活性分子，可包覆

於一外殼中，該外殼包含一聚合物、玻璃或任一介電材料。美國專利號5,714,389，描述一種橫向流動免疫試驗法，以及使用染色顆粒之測試裝置，該顆粒可為金屬膠體溶液，尤其是金。類似地，美國專利號7,109,042係描述一種橫向流動免疫試驗裝置，其使用直接標記，如金溶膠與染料溶膠，其可產生立即分析結果，而不需加入其他試劑，以顯現該可偵測訊號。

SERS為化學分析最敏感方法之一，可偵測單一分子。請見Nie, S. and S. R. Emory, “Probing Single Molecules and Single Nanoparticle by Surface Enhanced Raman Scattering”, *Science*, 275,1102 (1997)。拉曼光譜，類似於紅外線光譜，包括對應於待分析物(分析物)特定分子振動之光帶波長分佈。在實施拉曼光譜分析時，光源一般為雷射，係聚焦於樣本上，因而產生非彈性散射光，其經光學收集，並推導為波長分散或傅立葉(Fourier)轉換光譜，其中偵測器係將照射光子之能量轉換為電流訊號強度。

入射光轉換為非彈性散射光之效率非常低，限制了拉曼光譜之應用，非常難以紅外線光譜進行，如分析水性溶液。然而，於1974年發現，當一分子接近粗糙化之銀電極時，將其置於拉曼激發光源下，可使訊號增加，幅度達6倍。(Fleischmann, M., Hendra, P. J., and McQuillan, A. J., “Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode,” *Chem. Phys. Lett*, 26, 123, (1974), and Weaver, M. J., Farquharson, S., Tadayyoni, M. A., “Surface-enhancement

factors for Raman scattering at silver electrodes. Role of adsorbate-surface interactions and electrode structure,” J. Chem. Phys., 82, 4867-4874 (1985))。簡言之，入設雷射光子耦合至金屬中侷限於顆粒表面之自由導電電子，會導致電子雲共振。所得之表面電漿子場為一有效之路徑，可將能量轉移為場內分子之分子振動模式，因而產生拉曼光子。

SERS奈米顆粒已於橫向流動偵測免疫試驗中使用作為偵測分子。例如，Oxonica (Kidlington, UK)已發展出Nanoplex™ 奈米顆粒，使用於此試驗中。該奈米顆粒係由金奈米顆粒核心組成，其上吸附有拉曼報導子(reporter)分子，可產生表面強化拉曼光譜訊號。該拉曼標記之金奈米顆粒係塗覆有二氧化矽外殼，約10-50 nm厚。二氧化矽外殼可保護報導子自表面脫附，預防鄰近金顆粒間之電漿子-電漿子交互作用，亦預防溶液成分產生SERS訊號。在二氧化矽外衣上有聚合物塗覆之SERS奈米顆粒，係描述於美國專利申請公開號2007/0165219。

當使用高敏感度SERS時，偵測由SERS奈米顆粒產生之訊號需要使用可偵測拉曼訊號之儀器。在某些情況下較佳具有可用於橫向流動免疫試驗之奈米顆粒，其具有增進之敏感度，與SERS奈米顆粒相較，但僅需要相當簡單且不昂貴之反射讀取技術，用於偵測。

【發明內容】

發明概要

本發明係提供一種快速且準確之方法，以定性或定量

測定生物樣本中分析物之存在，並提供一種裝置與試劑，以進行該方法。

本發明人已發現，使用於橫向流動或直式流動免疫試驗中作為偵測分子之經塗覆奈米顆粒，可提供明顯之試驗敏感度，與其他偵測分子相較，如膠體金，當試驗以反射讀取儀讀取時。

在某些案例中，本發明為一經塗覆之奈米顆粒，包含一核心與可增加奈米顆粒反射度之外殼，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一具拉曼(Raman)光譜活性分子。在其他實施例中，該經塗覆奈米顆粒包括一拉曼活性分子。該核心可為，但不受限制，金屬，如具有電漿子共振之金屬，如金。

在某些實施例中，該外殼包含二氧化矽，而在其他實施例中，該外殼則為另一陶瓷材料，如另一氧化物，而在其他實施例中，該外殼則包含一聚合物。該聚合物可為，但不受限制，聚乙二醇、聚甲基甲基丙烯酸酯，或聚苯乙烯。該外殼可完全或不完全環繞該核心。

本發明經塗覆之奈米顆粒可形成為不同尺寸之各種形狀，包括，但不侷限於，球狀、棒狀、圓盤狀、金字塔狀、立方體、圓柱等。在某些實施例中，該經塗覆奈米顆粒具有至少一尺寸範圍為約1 nm至約1000 nm。在另一實施例中，該經塗覆奈米顆粒之核心為球狀。在某些案例中，該核心直徑為約10-100 nm，而在其他實施例中，該核心直徑為約20-60 nm。在某些實施例中，該奈米顆粒包含多層核

心聚集物，如但不侷限於，雙層。

在某些案例中，該奈米顆粒之外殼係經修飾，以使分子結合至奈米顆粒表面上。在特定實施例中，該修飾係將硫基加至經塗覆奈米顆粒表面上。在其他實施例中，一配位體如，但不侷限於，一抗體，係結合至經塗覆奈米顆粒之外殼上，經由硫基。

該配位體可結合至任一有興趣之分析物上，其存在或不存在於一樣本中。在某些實施例中，該配位體為一抗體，可結合至特異於流感病毒A或流感病毒B之蛋白質上。

在某些其他實施例中，本發明為一經塗覆之奈米顆粒，實質上係由一核心與可增加奈米顆粒反射度之外殼，以及一結合至外殼表面上之配位體組成。

在其他實施例中，本發明為一種測試裝置，用於測定液體樣本中分析物是否存在，包含：(a)一樣本接收元件；(b)一載體，與樣本接收元件呈液體連通；(c)一標記試劑，在液體樣本存在下，其於載體中為可移動，該標記試劑包含一與分析物結合之配位體，以及一經塗覆之奈米顆粒，其包含一核心以及一外殼，該外殼可增加具有配位體聯結於其上之奈米顆粒之反射度，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一具拉曼(Raman)光譜活性之分子；以及(d)一結合試劑，可有效捕捉該分析物，當存在時，其固定於載體之經定義偵測區域上；其中該液體樣本係施加於樣本接收元件上，使該標記試劑流動，使得該樣本與標記試劑可沿著載體長邊運送，到達偵測區域，其中，若偵測區域偵測到標

記試劑，代表液體樣本中存在有分析物。

在某些實施例中，該使用於測試裝置中之標記試劑包含一與分析物結合之配位體，以及一經塗覆奈米顆粒，實質上由一核心以及一外殼組成，該外殼可增加具有配位體聯結於其上之奈米顆粒之反射，其中該配位體係結合至外殼表面上。

在某些實施例中，該載體，如，但不侷限於，硝基纖維素、塑膠或玻璃。在其他實施例中，該測試裝置更包含一吸收墊及/或控制區域，與偵測區呈液體連通。

本發明之測試裝置可用於定性或定量偵測有興趣分析物之存在，如但不侷限於，一蛋白質、核酸、代謝物、小分子、病毒或細菌。在某些實施例中，該測試裝置可用於偵測液體樣本中之多種分析物，其具有至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體可結合至不同分析物上，以及至少二偵測區域，可偵測該至少二不同標記試劑之每一者。

在某些實施例中，本發明為一系統，包含本發明之測試裝置，以及一反射儀，用以偵測測試裝置中標記試劑之存在。

在某些實施例中，本發明為一種測定液體樣本中分析物是否存在之方法，包含：

- a)提供本發明之測試裝置；
- b)將該液體樣本與該測試裝置之樣本接收元件接觸；
- c)將該液體樣本施加於樣本接收元件上，以使該標記

試劑流動，使得該液體樣本與標記試劑可沿著載體長邊運送，到達偵測區域；

d)藉由測量反射度來測定偵測區域中是否有標記試劑存在，其中偵測區域若偵測到標記試劑，代表液體樣本中存在有該分析物；偵測區域若未偵測到標記試劑，代表液體樣本中不存在有該分析物。

在其他實施例中，本發明為一種測定液體樣本中分析物是否存在之方法，包含：

a)提供一測試裝置，包含：(i)一樣本接收元件；(ii)一載體，與樣本接收元件呈液體連通；以及(iii)一結合試劑，可有效捕捉該分析物，當存在時，其係固定於載體之經定義偵測區域上；

b)將該液體樣本與標記試劑混合，該標記試劑包含一可結合至分析物之配位體，以及一經塗覆之奈米顆粒，其包含一核心以及一外殼，該外殼可增加具有配位體聯結於其上之奈米顆粒之反射度，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一具拉曼(Raman)光譜活性分子；

c)將b)之混合物與測試裝置之樣本接收元件接觸；

d)將b)之混合物施加於樣本接收元件上，沿著載體長邊運送，到達偵測區域；

e)藉由測量反射度來測定偵測區域中是否有標記試劑存在，其中偵測區域若偵測到標記試劑，代表液體樣本中存在有該分析物；偵測區域若未偵測到標記試劑，代表液體樣本中不存在有該分析物。

在某些實施例中，使用於本發明方法中之標記試劑包含一與分析物結合之配位體，以及一經塗覆之奈米顆粒，其其實質上由一核心以及一外殼組成，該外殼可增加具有配位體聯結於其上之奈米顆粒之反射度，其中該配位體係聯結至該外殼表面上。在其他實施例中，使用於本發明方法中之標記試劑包含一與分析物結合之配位體，以及一經塗覆之奈米顆粒，其包含一核心，在核心上聯結有一分子，可藉由表面強化拉曼散射產生訊號，以及一外殼，環繞該核心與該分子，並具有配位體聯結於其上。

在某些實施例中，一反射讀取儀係用於測定偵測區域內之標記試劑，而在其他實施例中，偵測區域內標記試劑之偵測係為目視。在某些實施例中，該分析物可定量分析，而在其他實施例中，該分析物係定性分析。在某些實施例中，本發明方法可用於偵測液體樣本中多種分析物，使用至少兩種標記試劑，其中該標記試劑上之配位體會與不同分析物結合，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。

在其他實施例中，本發明為一種用於進行流式分析測試之套組，藉由反射法偵測液體樣本中分析物是否存在，包含：(a)一測試裝置，包含一孔狀薄膜，其包含一上表面與下表面，以及一結合試劑，可有效捕捉該分析物，當存在於液體樣本中時，其係附著於該孔狀薄膜之上表面或下表面；以及(b)一標記試劑，包含與分析物結合之配位體，以及經塗覆之奈米顆粒，其包含一核心以及一可增加該奈

米顆粒反射度之外殼，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一具拉曼(Raman)光譜活性之分子。

在某些實施例中，使用於本發明套組中之標記試劑包含一可結合至分析物之配位體，以及一經塗覆之奈米顆粒，實質上由一核心以及一外殼組成，該外殼可增加具有配位體聯結於其上之奈米顆粒之反射度，其中該配位體係結合至外殼之表面上。在其他實施例中，使用於本發明套組中之標記試劑包含一與分析物結合之配位體，以及一經塗覆之奈米顆粒，其包含一核心，一聯結至核心之分子，可藉由表面強化拉曼散射產生訊號，以及一環繞該核心與該分子之外殼，其具有配位體聯結於其上。

在某些實施例中，本發明套組之測試裝置更包含一吸收墊，其中該孔狀薄膜之下表面與吸收墊呈物理性接觸，並以流體連通，以及其中該結合試劑係聯結至該孔狀薄膜之上表面。在其他實施例中，本發明套組之測試裝置更包含一孔狀薄膜之外罩。

本發明套組可用於定性或定量偵測有興趣之分析物是否存在，如，而不受侷限於一蛋白質、核酸、代謝物、小分子、病毒或細菌。在某些實施例中，該套組可用於偵測液體樣本中多種分析物，以至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體可結合至不同分析物上，以及至少二偵測區域，可偵測該至少二不同標記試劑之每一者。

在某些實施例中，本發明為一種系統，包含本發明之套組，以及一反射儀，用以偵測測試裝置中標記試劑之存在。

在其他實施例中，本發明為一種使用本發明之套組測定液體樣本中分析物是否存在之方法，該方法包含：(a)將該液體樣本與該孔狀薄膜之上表面接觸；(b)使該液體樣本流過該孔狀薄膜，使得至少一部分之分析物，當存在於液體樣本中時，可結合至結合試劑上；(c)將該標記試劑與該孔狀薄膜之上表面接觸；(d)使該標記試劑流過該孔狀薄膜並進入吸收材料，使得至少一部份之標記試劑可結合至分析物上；以及(e)藉由測量反射度偵測孔狀薄膜上標記試劑之存在，其中該孔狀薄膜上若偵測到標記試劑，代表液體樣本中存在有該分析物；該孔狀薄膜上若未偵測到標記試劑，代表液體樣本中不存在有該分析物。

在其他實施例中，本發明為一種使用本發明套組測定液體樣本中分析物是否存在之方法，該方法包含：(a)混合液體樣本與標記試劑，使得該分析物，當存在於液體樣本中時，可與該標記試劑結合；(b)將(a)之混合物與孔狀薄膜之上表面接觸；(c)使(a)之混合物可流過該孔狀薄膜，使得至少一部分已與標記試劑結合之分析物，當存在於液體樣本中時，可結合至該結合試劑上；以及(d)藉由測量反射度偵測孔狀薄膜上標記試劑之存在，其中該孔狀薄膜上若偵測到標記試劑，代表液體樣本中存在有該分析物；該孔狀薄膜上若未偵測到標記試劑，代表液體樣本中不存在有該分析物。

在某些實施例中，該反射讀取儀係用於測定偵測區域內之標記試劑，而在其他實施例中，偵測區域內標記試劑

之偵測係為目視。在某些實施例中，該分析物可定量分析，而在其他實施例中，該分析物係定性分析。在某些實施例中，本發明方法可用於偵測液體樣本中多種分析物，使用至少兩種標記試劑，其中該標記試劑上之配位體會與不同分析物結合，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。

圖式簡單說明

第1圖顯示A型流感病毒之橫向流動試驗結果，係比較膠體金與經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒之敏感度，當以反射儀測量時。如圖中所示，經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒觀察到強烈的反應，與金膠體比較。

第2圖顯示顯示A型流感病毒之橫向流動試驗結果，係比較使用經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒之原型裝置敏感度(第2A圖)，以及商用產品，BD Directigen™ EZ A+B(第2B圖)之敏感度，此二裝置皆以反射儀讀取。使用經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒之裝置敏感度約為BD Directigen™ EZ A+B之7倍，以反射儀讀取。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

除非另有定義，所有於此使用之技術與科學術語皆具有與此技術領域者通用之意義。雖然這些方法與材料皆類似或等同於申請專利範圍中所描述者，較適用之方法與材料皆如下所述。本文提及之所有文獻、專利申請案、專利案，與其他參考文獻，皆在此併入本案以作為參考資料。

為了避免衝突，本說明書，包括定義，皆有控制。此外，該材料、方法，與範例僅用於說明，並非用於限制。

在此說明書中，單數描述亦包括複數，除非另有陳述。在此說明書中，“或”代表“及/或”，除非另有指出。在多個附屬項中，“或”一字之使用係指大於一項之前述獨立或附屬項，僅用於替換使用。此外，術語“包括”，可使用多種形式，如“包括”與“包含”，不受限制。此外，術語如“元件”或“組成物”包含元件與組成物二者，包括一單元與包含大於一種次單元之元件與組成物，除非另有指出。

其他特徵與優點將以下列發明詳述與申請專利範圍說明而更臻清楚。

為了使本說明書更加易懂，係先定義某些術語。額外之定義係分佈於詳細說明中。

術語“奈米顆粒”使用於此係指該顆粒包含至少一核心與一外殼，具有一尺寸範圍約1至約1000奈米(“nm”)。本發明之奈米顆粒可為任一形狀。在某些實施例中，該奈米顆粒為球狀。本發明之奈米顆粒一般不，但可，包含一拉曼活性分子。在某些實施例中，該奈米顆粒可包含多層核心與一層外殼。

使用於此，術語“核心”係指本發明奈米顆粒之內部。在某些實施例中，該核心為金屬，例如，但不侷限於金。

本發明之奈米顆粒亦包含一外殼，其可增加奈米顆粒之反射度。該外殼可完全包覆該核心，或不完全包覆該核心。該外殼可由任一材料或材料組合物組成，只要其具有

可增進奈米顆粒反射度之特性。例如，在某些實施例中，該外殼可包含任何穿透材料，在所需光譜範圍內。在某些實施例中，該外殼包含二氧化矽，即，玻璃。在其他實施例中，該外殼包含另一陶瓷材料，例如但不侷限於，具有高折射指數之透明陶瓷，如鈣鈦礦與 ZrO_2 。在其他實施例中，該外殼係由聚合物組成。在一特定實施例中，該聚合物包含聚乙二醇、聚甲基甲基丙烯酸酯，或聚苯乙烯。在某些實施例中，該形成外殼之材料係經處理或經衍生，可聯結一配位體至該奈米顆粒表面。該聚合物之最佳選擇係取決於待固定於奈米顆粒表面之配位體。

在外殼中，術語“增加奈米顆粒反射度”代表外殼之存在可導致奈米顆粒產生增加之訊號或敏感度，當以反射度測量時，如於橫向流動免疫試驗中，與不具外殼之奈米顆粒相較。不受限於理論，環繞於核心之外殼可直接使顆粒反射更多光線。此外，結合至外殼表面之配位體可定位地更好，以參與結合反應，當結合至外殼材料上，當被動吸附於核心表面上。

使用於此，“配位體”係指可結合至有興趣分析物之任一分子。例如，而不受侷限，在某些實施例中，該配位體為一抗體、抗原、受體、核酸或酵素。

術語“分析物”使用於此係指任一可使用本發明偵測之有興趣物質，包括但不侷限於，藥物，包括治療用藥物或濫用之藥物；賀爾蒙；維生素、蛋白質，包括所有種類之抗體；胜肽；類固醇；細菌；黴菌；病毒；寄生蟲；細菌、

黴菌、病毒、寄生蟲之成分或產物；所有種類之過敏原；一般或惡性癌細胞之產物或成分；等。作為特定範例，其可為人類絨毛膜性腺激素(hCG)；胰島素；黃體素；導致或與多種疾病狀態相關之生物體，如化膿性鏈球菌(A群)、單純疱疹I與II、巨細胞病毒、衣原體、德國麻疹抗體、A型與B型流感病毒等。在本發明之某些實施例中，樣本中分析物是否存在係以定性決定。在其他實施例中，樣本中分析物之濃度或含量係以定量決定。

術語“樣本”使用於此係指任一生物樣本，其含有用於偵測之分析物。在某些實施例中，該生物樣本為液體形式，而在其他實施例中，可變化為液體形式。

術語“樣本接收元件”使用於此係指測試裝置之一部分，其直接與液體樣本接觸，亦即，其可接收待分析之有興趣分析物樣本。該樣本接收元件可為載體或孔狀薄膜之一部分或單獨元件。該液體樣本之後可自樣本接收元件流出，經橫向或垂流通動，流往偵測區域。該樣本接收元件係與分析物偵測區域呈液體連通。可能為重疊、頂部對底部或末端相連。在某些實施例中，該樣本接收元件係由孔狀材料製造，例如但不侷限於，紙。

使用於此，術語“載體”，如用於橫向流動試驗中，係指任一可提供液體流動之基板。此包括基板如硝基纖維素膜、與聚酯類或纖維素摻合之硝基纖維素膜，未經處理之紙、孔狀紙、螺縐、玻璃纖維、丙烯腈共聚物、塑膠、玻璃或耐隆。該基板可為孔狀。一般而言，該基板之孔具有

足夠大之尺寸，使得本發明之奈米顆粒可完全流過該載體。熟習此技術領域者應知道其他可允許液體流通之材料。該載體可包含一或多個呈液體連通之基板。例如，該反應區域與偵測區域可存在於在載體內之同一基板(即，墊)上，或可於不同基板(即，墊)上。

使用於此，用於流式試驗中之“孔狀薄膜”係指任一材料之薄膜或濾紙，其可立即以水性溶液濕潤，並具有足以使本發明經塗覆之奈米顆粒通過之孔。適當之材料包括如硝基纖維素膜、與聚酯類或纖維素摻合之硝基纖維素膜，未經處理紙、孔狀紙、螺縲、玻璃纖維、丙烯腈共聚物、塑膠、玻璃或耐隆。

使用於此，“吸收材料”係指一具有吸收特性之孔狀材料，足以吸收試驗試劑中與任一清洗溶液中實質上之所有液體，以啟動毛細現象，並將試驗液體吸至測試裝置中。適當之材料包括，如硝基纖維素膜、與聚酯類或纖維素摻合之硝基纖維素膜，未經處理紙、孔狀紙、螺縲、玻璃纖維、丙烯腈共聚物、塑膠、玻璃或耐隆。

使用於此，術語“橫向流動”係指一液體沿著載體平面流動。一般而言，橫向流動裝置可包含一長條(或數個以液體連通之長條)，其材料可藉由毛細作用，即潤濕或層析作用，傳送一溶液，其中該長條之不同區域或區塊含有試驗試劑，不論是以擴散性或非擴散性結合，當溶液傳送或通過此區域時可產生可偵測訊號。一般而言，此試驗包含一施加區域，用於接收液體樣本，試劑區域則設置於施加區

域之側面並呈液體連通，偵測區域亦設置於施加區域之側面並與試劑區域呈液體連通。該試劑區域可包含一化合物，其在液體中為動相，並可與樣本中之分析物及/或偵測區域上結合之分子產生交互作用。該偵測區域可包含一結合分子，其固定於長條上並可與分析物及/或試劑化合物產生交互作用，以產生可偵測訊號。此試驗可用於偵測樣本中之分析物，經由直接(夾層試驗法)或競爭結合作用。橫向流動裝置之範例係提供於美國專利號6,194,220，Malick等人提申；5,998,221，Malick等人提申；5,798,273，Shuler等人提申；以及RE38,430，Rosenstein提申。

在夾層橫向流動試驗中，包含或不包含有興趣分析物之液體樣本係施加於施加區域，並使其藉由毛細作用通過試劑區域。該分析物，若存在，可與試劑區域內之標記試劑作用，且該分析物-試劑錯合物會藉由毛細現象移動至偵測區域。該分析物-試劑錯合物可由偵測區域捕捉，藉由與特異於分析物之結合分子及/或試劑產生交互作用。未結合樣本可藉由毛細作用移動通過偵測區域，到達橫向置放並與偵測區域呈流體連通之吸收墊。該標記試劑之後可於偵測區域以適當裝置偵測。

在競爭橫向流動試驗中，含有或不含有興趣分析物之液體樣本係施加至施加區域，並允許其藉由毛細作用通過試劑區域。該試劑區域包含一標記試劑，其可為分析物本身、其類似物或衍生物，或一可模擬有興趣分析物之片段，當結合至偵測區域之固定結合物上。該標記試劑在液相中

為動態，並與液體樣本一同藉由毛細作用移動至偵測區域。液體樣本中所含之分析物會與標記試劑競爭結合至偵測區域之固定結合物上。未結合之樣本可藉由毛細作用移動通過偵測區域，到達橫向置放並與偵測區域呈流體連通之吸收墊。該標記試劑之後可於偵測區域以適當裝置偵測。有興趣分析物存在與否可經由檢測偵測區域而得，其中若液體樣本中存在之分析物量越多，則偵測區域結合之經標記受體量則越少。

使用於此，術語“垂直接過”與“流經”係指液體流至載體之垂直平面上。一般而言，流動裝置可包含元件或層層堆疊之元件層，其可允許液體流過該裝置。各層可包含試驗試劑，不論是擴散或非擴散性結合，當溶液通過裝置時其可產生可偵測訊號。一般而言，該裝置包含第一層，具有一上表面與下表面，其中該上表面係用於接收液體樣本，以及一垂直置放之吸收層，並與第一層之下表面呈液體連通，其用於吸引液體樣本通過該第一層。該第一層可包含一結合試劑，聯結於第一層之上表面，可與樣本中之分析物接觸，並捕捉該分析物於第一層之上表面。流通裝置之範例係提供於美國專利號4,920,046，McFarland等人提申，以及7,052,831，Fletcher等人提申。

實際上，包含或未包含有興趣分析物之液體樣本係施加於第一層之上表面，該處包含一特異於有興趣分析物之結合試劑。之後該液體樣本流過該第一層，到達吸收層。若分析物存在於樣本中，其會與結合試劑產生交互作用，

而被第一層之上表面捕捉。該第一層之後以清洗溶液處理，依據一般免疫試驗流程。之後，該第一層以標記試劑處理，其與被結合試劑捕捉之分析物結合。該標記試劑之後流經該第一層，並到達吸收層。該第一層以清洗溶液處理，依據一般免疫試驗流程。之後該標記試劑以適當裝置偵測。此外，該液體樣本可與標記試劑混合，在施加至該第一層上表面之前。其他適當變化為此技術領域者所熟知。

橫向與流式試驗可用於偵測樣本中多種分析物。例如，在橫向流動試驗中，試劑區域可包含多種標記試劑，每一者皆可結合(或模擬)至液體樣本中之不同分析物，或單一標記試劑可結合(或模擬)多種分析物。此外，橫向流動試驗中之偵測區域可包含多種結合分子，每一者皆可結合至液體樣本中之不同分析物，或單一標記試劑可結合(或模擬)多種分析物。在流通試驗中，該孔狀薄膜可包含多種結合試劑，每一者皆結合至液體樣本中之不同分析物，或單一標記試劑可結合(或模擬)多種分析物。此外，標記試劑混合物可用於流通試驗中，每一者皆設定為可與液體樣本中之不同分析物結合，或單一標記試劑可結合(或模擬)多種分析物。若多種標記試劑用於橫向流動或流式試驗中，該試劑可分別標記，以辨識液體樣本中不同種類之分析物。

使用於此，術語“動相”係指擴散性或非擴散性聯結或注入。動相之試劑可以液體樣本分散，並可由液體樣本攜帶於橫向或垂直流體中。

使用於此，術語“標記試劑”係指任一可辨識或結合至

有興趣之分析物上之顆粒、蛋白或分子，其上並聯結有一可產生訊號之物質，以視覺或儀器偵測，亦即，於此處定義之經塗覆奈米顆粒。辨識該分析物之顆粒或分子可為天然或非天然。在某些實施例中，該分子為單株或多株抗體。

使用於此，術語“結合試劑”係指任一顆粒或分子，其可辨識有興趣之分析物。該結合試劑可與分析物-標記試劑錯合物形成一結合錯合物。該結合試劑係固定於偵測區域之載體上，或孔狀薄膜之表面。該結合試劑並不會受到液體樣本之橫向流動或垂直流影響，由於已固定於載體或孔狀薄膜上。該顆粒或分子可為天然或非天然，亦即，合成物。一旦該結合試劑結合至分析物-標記試劑錯合物上，其便可阻止分析物-標記試劑在液體樣本中之流動。

使用於此，“偵測區域”係指載體或孔狀薄膜部分，含有經固定之結合試劑。

術語“控制區域”係指測試裝置之一部分，包含一結合分子，設置為捕捉該標記試劑用。在橫向流動試驗中，該控制區域可與載體之偵測區域呈液體連通，使得該標記試劑可在控制區域被捕捉，當液體樣本藉由毛細作用傳送至偵測區域時。在流式試驗中，該控制區域可為孔狀薄膜之單獨區域，如該標記試劑可施加於孔狀薄膜之樣本施加部分與控制區域二者上。控制區域中標記試劑之偵測，係確認該試驗可達到功能目的。

術語“外罩係指任一適合包覆本發明測試裝置者。示範性外罩可為此技術領域所熟知者。該外罩可為如，一基底

部分與一上蓋部分。該上蓋可包括一頂壁與一實質上垂直之側壁。一邊緣，可向上突出於該頂壁。該邊緣係定義一凹口，其內具有一插入物，具有至少二開口，可與上蓋之至少二其他開口互相對準，以形成該外罩之至少二孔。該外罩可建構為確保該二或多孔間不會互相連通。此外罩之一範例係提供於美國專利號7,052,831，Fletcher等人提申。其他適當之外罩包括使用於BD Directigen™ EZ RSV橫向流動試驗裝置中者。

使用於此，“反射讀取儀”或“反射儀”係指一裝置，偵測由於測試裝置偵測區域中經塗覆奈米顆粒之存在而造成之反射度改變。反射讀取儀或反射儀為技術上已知。適用於本發明之代表性儀器包括，但不侷限於，Immunochromato Reader C10066，得自Hamamatsu，或ESE-Quant，得自ESE GmbH。該偵測區域最佳係由該裝置之偵測區域掃描，或直接成像於反射儀之偵測器上，而可追蹤空間位相上之反射度。之後係使用適當演算法測定，如偵測區域內反射度之最大變化量。

用於SERS-基礎法中之經塗覆奈米顆粒為技術上已知。如美國專利號6,514,767，係描述SERS-活性複合物奈米顆粒(SACNs)，其包含一金屬奈米顆粒，於其表面與一或多個拉曼活性分子聯結或結合，並由一外殼包覆，其包含一聚合物、玻璃，或任一其他介電材料。此顆粒可藉由在拉曼活性金屬奈米顆粒核心上成長或者置放一適用於包覆之外殼。具有希望尺寸之金屬奈米顆粒可成長為金屬膠體，

使用多種此領域已知之技術，如使用還原劑使溶液中金屬離子進行化學或光化學還原。舉例而言，膠體金顆粒，其為次微米尺寸金顆粒流體懸浮液，可藉由氯金酸(chloroauric acid)於液體中還原。酸溶解後，該溶液係快速攪拌，同時加入還原試劑。此會導致金離子還原成中性金原子，其會自過飽和溶液中沈澱出，並形成顆粒。為了預防顆粒凝聚，可加入黏附於奈米顆粒表面上之穩定試劑。奈米顆粒亦可於溶液中以放電法製造。該顆粒可以各種有機配位體功能化，以創造出有機-無機雜合物，具有增進之功能性。

適當之包覆物包括玻璃、聚合物、金屬、金屬氧化物以及金屬硫化物。若該包覆物為玻璃，則該金屬奈米顆粒核心較佳先以玻璃底層處理。之後玻璃係以一般技術於金屬奈米顆粒上成長。該包覆物之厚度可依據該顆粒需要之物理特性而輕易變化。該外殼可以一般技術衍生，使該顆粒可共軛至分子上(包括生物分子，如蛋白質與核酸)，或至固體支撐物上。

商業上可獲得之Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒係由金奈米顆粒核心組成，其上吸附有拉曼報導子分子，可產生SERS訊號。該拉曼標記金奈米顆粒之後以約10-50 nm厚之二氧化矽外殼經塗覆。該二氧化矽外殼可保護報導子分子自核心表面上脫附、預防鄰近金顆粒間電漿子-電漿子交互作用，亦預防溶液內成分產生SERS訊號。

就以反射讀取儀偵測之橫向流動試驗而言，吾人可預

期Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒提供相當好之試驗敏感度，可與具相同直徑，作為Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒核心，並使用相同之光學密度之金顆粒比擬。此外，本發明人觀察到未預期且明顯較佳之試驗敏感度，當金顆粒被Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒取代時，於具有反射讀取儀取代拉曼訊號偵測器之橫向流動試驗中。重要的是，由Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒增進之敏感度，若僅調整未經塗覆金膠體之直徑並無法達成。此外，亦相當重要地，當Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒使用作為標記試劑時，該試驗之敏感度相等，不論該訊號是以反射儀或SERS讀取儀讀取。

Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒中之拉曼活性分子一般認為對於試驗表現度並無幫助，當使用反射儀讀取訊號，而非拉曼讀取儀。此預期係由實驗產生，其中經二氧化矽塗覆之奈米顆粒(不具拉曼活性分子)，係發現其表現度相等，並用於反射儀基礎之橫向流動試驗中，提供明顯增進之敏感度，與僅有金之膠體相較。

範例

範例1：

此實驗係比較經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒與金膠體於橫向流動免疫試驗中之表現度，針對A型流感病毒。在此試驗中，經測試為A型流感病毒陰性之鼻咽抽出液，係以已知之活H1N1 A型流感病毒產生刺突(spiked)。

該金顆粒，得自 British Biocell International

(“BBInternational”; “BBI”), 直徑為40 nm。實驗中使用之經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒為Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒。這些奈米顆粒係由經拉曼報導子4,4'-二吡啶塗覆之60 nm金核心, 以及二氧化矽外殼組成。該二氧化矽外殼厚度約為30 nm。A型流感病毒偵測抗體係聯結至金膠體上, 藉由被動吸附。就Nanoplex™奈米顆粒而言, A型流感病毒偵測抗體係共價性結合至二氧化矽表面之硫基上, 透過順丁烯二醯胺化學。就二試驗而言, A型流感病毒捕捉抗體係塗佈於Whatman AE99硝基纖維素薄膜上。該硝基纖維素薄膜之後以液體(“浸漬片(dipstick)”)形式進行試驗, 其中該顆粒與偵測抗體係與含有各種含量病毒之鼻咽樣本混合。相同之光學密度係使用於金膠體與經塗覆之奈米顆粒。該顆粒/樣本混合物之後置於96-孔盤上, 具捕捉抗體之硝基纖維素薄膜之一端係置於每一孔中。該樣本可潤濕(wick up)該硝基纖維素薄膜, 之後充滿清洗緩衝液, 之後亦潤濕硝基纖維素薄膜直條。

由捕捉線獲得之訊號係以客製化反射儀讀取, Becton, Dickinson and Company (“BD”), UMM Electronics (Indianapolis, IN)。第1圖顯示反射儀訊號圖, 其為病毒濃度之函數, 用於橫向流動試驗, 具有金膠體與經塗覆之奈米顆粒。使用Oxonica 奈米顆粒有明顯較強反應, 與金膠體相較。

範例2：

在此範例中, 經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒之敏感

度，係與市售產物相較：BD Directigen™ EZ Flu A+B 試驗。如範例1所示，該經塗覆之金奈米顆粒係以浸漬片形式試驗，使用Whatman AE99硝基纖維素薄膜。該Directigen™ EZ Flu A+B係使用其商用實施例進行測試(“卡匣”形式)。BD Directigen™ EZ Flu A+B市售產物與Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒-基礎裝置所使用之捕捉與偵測抗體皆相同。樣本係依據範例1製備，除了使用活B/Lee/40 B型流感病毒，使其於陰性鼻咽抽物液中產生刺突，而非A型流感病毒。如前所述，實驗中使用之經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒為Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒。這些奈米顆粒係由經拉曼報導子4,4'-二吡啶塗覆之60 nm金核心，以及二氧化矽外殼組成。該二氧化矽外殼厚度約為30 nm。該BD市售產物係使用40 nm金膠體，其不包含二氧化矽外殼。該BD市售產物係依據包裝指示使用，僅具有測試線訊號，以反射儀讀取與視覺判定。

數據列於表1，其比較二顆粒之偵測極限(信賴偵測極限)。該信賴偵測極限(RDL)係定義為其95%信賴下極限等於空白組95%信賴上極限時之濃度。RDLs，以不定單位(X)表示，用於表示BD金膠體產物與經二氧化矽塗覆之奈米顆粒，係用於報導三個獨立的實驗。相同之客製化反射儀，得自UMM Electronics，係用於讀取來自經二氧化矽塗覆之奈米顆粒浸漬片裝置與Directigen™ EZ Flu A+B裝置之訊號。該敏感度增進倍數係定義為未經塗覆金基礎產物之RDL，除以經二氧化矽塗覆奈米顆粒產物之RDL。

表 1

	BD Directigen™ EZ 具有未經塗覆之金 (以反射儀讀取)	以 Oxonica 奈米顆粒 測試之橫向流動試驗 (以反射儀讀取)	敏感度 增進倍數
實驗 1	0.23	0.015	15
實驗 2	0.12	0.0075	16
實驗 3	0.26	0.028	9

如上表所示，該 Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒，最高可增進 16 倍敏感度，與純金顆粒相較。

在類似於上述之單獨實驗中，金膠體顆粒之直徑係由 40 nm 增加至 60 nm 與更大尺寸。在這些實驗中，僅觀察到有限的敏感度增進(至多 2 倍)，代表 Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒之金核心與金膠體尺寸上之差異，似乎並非敏感度增進之原因。
範例 3：

本實驗係比較金膠體與 Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒之敏感度與特異性，在偵測 B 型流感病毒 (B/Lee/40) 之橫向流動免疫試驗中。係製備 60 個臨床樣本。該樣本經測試皆為 B 型流感病毒陰性之鼻咽抽出液。20 個樣本作為陰性控制組。剩餘之 40 個樣本係以二濃度之 B 型流感病毒產生刺突，而產生 40 個陽性樣本。此 40 個樣本中之 20 個，係以濃度 0.5X (不定單位) 之活 B 型流感病毒產生刺突。剩餘之 20 個樣本則接受低 10 倍之 B 型流感病毒，濃度為 0.05X。所有 60 個樣本 (40 個陽性與 20 個陰性控制組) 之後皆使用 BD Directigen™ EZ Flu A+B 市售產品，為卡匣形式，以及使用 Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒製造之浸漬片裝置測試。該浸漬片裝置係使用 Whatman AE99 硝基纖維素薄膜製備。該 Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒係由經拉曼報導子 4,4'-二吡

淀塗覆之60 nm金核心，以及約30 nm厚之二氧化矽外殼組成。A+B係使用其商用實施例進行測試(“卡匣”形式)。BD Directigen™ EZ Flu A+B市售產物與Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒-基礎裝置所使用之捕捉與偵測抗體皆相同。

結果摘錄於表2。在此表中，敏感度係以每一次測試中，40個陽性樣本中正確辨識出之樣本之百分比計算。特異性係以每一次測試中，20個陰性樣本中正確辨識出之樣本之百分比計算。當使用儀器讀取時，若測試儀器讀取值大於每一種裝置內建之閾值，便可判定為陽性。該閾值係經建立，以使每一裝置至少確保95%之特異性。在此範例中，該Directigen™產物係以視覺判定，以及使用客製化反射儀，得自UMM Electronics，判定。Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒係使用相同之反射儀，以及相同之研究用拉曼讀取儀，由BD建構(表中最後一排)偵測。研究用拉曼讀取儀係使用785 nm雷射作為激發光，並使用Acton研究用光譜儀(SpectraPro 25000i)與CCD偵測器(Pixis 400)偵測拉曼訊號。

表2

測試	敏感度	特異性
Directigen™ EZ，視覺判別	45%	100%
Directigen™ EZ，反射儀讀取	58%	95%
Oxonica nanotags，反射儀讀取	100%	100%
Oxonica nanotags，拉曼讀取	100%	100%

由此可發現一明顯之敏感度增進，使用Oxonica Nanoplex™奈米顆粒時，與Directigen™ EZ顆粒相較，而不會損失特異性。

範例4：

本實驗係比較經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒，具有或不具有表面增強拉曼散射(SERS)分子之表現度，於反射度基礎之橫向流動免疫試驗中。

Oxonica NanoplexTM之金奈米顆粒，含有SERS標記，係得自Oxonica。該奈米顆粒係由60 nm金核心，末端有4-4'-二吡啶與35 nm厚經塗覆之二氧化矽外殼。該奈米顆粒之直徑為130 nm。硫代-SMCC 化學法(Pierce #22622)係用於將A型流感病毒抗體共價性聯結至奈米顆粒之表面硫基上。

缺乏SERS標記之60 nm直徑金奈米顆粒，係購自BBI。該金奈米顆粒之後經下列流程以二氧化矽塗覆。10 mL之60 nm金膠體(BBI, $\sim 2.6 \times 10^{10}$ particles/mL)首先以75 μ L之100 μ M 3-巰丙基三乙氧基矽烷之乙醇溶液處理。3小時後，加入75 μ L之2.7%矽酸鈉溶液，反應繼續24小時。下一步驟中，40 mL乙醇係加至懸浮液中，之後加入1 mL氨水與300 μ L (5%之乙醇溶液)之四乙基原矽酸鹽。反應維持攪拌2天，最終以重複離心法純化。由此方法製得之二氧化矽塗覆物厚度為30 nm，經二氧化矽塗覆金之總顆粒直徑為120 nm。之後硫基係加至該經二氧化矽塗覆之金顆粒上，藉由將經玻璃塗覆之金奈米顆粒水性懸浮液(10 mL, $\sim 2.6 \times 10^{10}$ 顆粒/mL，與1%巰丙基三甲氧基矽烷(MPTMS)之乙醇溶液，於室溫下反應24小時。MPTMS溶液之量係由25 μ L變化至100 μ L，以於接近載入量之0.5、1.0、1.5與2.0倍(例如，2.0為0.5之4X)，產生各種量之表面活性硫基，經由非最佳化製程。反應之後，顆粒經重複離心法於水中純化。硫代

-SMCC化學法(Pierce #22622)係用於將A型流感病毒抗體共價性聯結至奈米顆粒之表面硫基上。

橫向流動免疫試驗係以下列浸漬片形式進行。A型流感病毒捕捉抗體係施加於Whatman AE99硝基纖維素直條上。該硝基纖維素直條係浸入含有奈米顆粒之溶液樣本中，其調整至光學密度為10，並含有各種濃度之A型流感H1N1病毒。該樣本溶液可完全濕潤該硝基纖維素直條。之後加入清洗緩衝液，並亦濕潤該硝基纖維素薄膜直條。之後該直條乾燥，反射度係使用Hamamatsu反射儀模組C10066讀取。結果摘錄於表3。

表3

奈米顆粒種類	LOD-反射度讀取儀 (單位X，測量為RDL)
Oxonica Nanoplex™ SERS，以4,4'-二吡啶拉曼報導子分子標記-重複1	0.0471
Oxonica Nanoplex™ SERS，以4,4'-二吡啶拉曼報導子分子標記-重複2	0.0564
經二氧化矽塗覆之金，不具有拉曼報導子分子-硫基載入“0.5”	0.0901
經二氧化矽塗覆之金，不具有拉曼報導子分子-硫基載入“1.0”	0.135
經二氧化矽塗覆之金，不具有拉曼報導子分子-硫基載入“1.5”	0.1063
經二氧化矽塗覆之金，不具有拉曼報導子分子-硫基載入“2.0”	0.062

表3之資料顯示，若經最佳化，該不具有SERS報導子之經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒，表現度與具有SERS報導子之奈米顆粒一樣好，在橫向流動免疫試驗中，當使用反射讀取儀時。此外，經二氧化矽塗覆之金顆粒表現度係依據硫化程度而決定。

範例5：

此實驗係用於測試橫向流動原型裝置之表現度，其用

於偵測臨床樣本中活H1N1 A型流感病毒，使用Oxonica NanoplexTM經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒作為報導子。該Oxonica顆粒具有一直徑約60 nm之金核心，一拉曼報導子4,4'-二吡啶，以及二氧化矽外殼，約35 nm厚。該卡匣基礎之原型裝置，係與BD DirectigenTM EZ Flu A+B市售產品使用相同之捕捉與偵測抗體，並以相同方式使用。

測試裝置之原型係包含一背部直條支撐Millipore HF135硝基纖維素橫向流動薄膜之長邊部分。特異於流感病毒A核蛋白(Flu A NP)之捕捉抗體係塗佈橫越此薄膜，形成測試線。抗物種免疫球蛋白抗體係塗佈鄰近於測試線，形成控制線。Oxonica NanoplexTM SERS奈米顆粒塗覆於組合墊上(Arista MAPDS-0399)，其經10% SEABLOCK溶液(Pierce 37527)處理。該奈米顆粒係與一Flu A NP偵測抗體結合。該組合墊附著於背部直條上，其位於橫向流動薄膜之一端。在橫向流動薄膜之對側，係聯結一吸收濕潤墊(Whatman #470)。所得之橫向流動試驗直條係置於二部分聚苯乙烯卡匣中。此卡匣可完全密封該試驗直條，除了有一中央視窗，可看到LF薄膜之試驗與控制區域，以及一樣本施加孔，位於共軛墊之中心。此卡匣外罩係用於BD DirectigenTM EZ RSV橫向流動試驗裝置中。

類似於範例1，測試為A型流感病毒陰性之小兒科鼻咽抽出物樣本，係以已知量之活A型流感病毒產生刺突。刺突化樣本中之最終病毒濃度範圍為0.25X (不定單位)至0.0039X，以二倍系列稀釋。以無病毒稀釋介質刺突化("0X")

之樣本係作為控制組。加入活病毒後，一系列之樣本係經處理，使用BD Directigen™ EZ Flu A+B樣本製備流程。簡言之，經A型流感病毒-刺突化之樣本，係與萃取試劑於彈性樣本試管中混合。該經萃取之樣本之後經玻璃纖維過濾尖頭過濾並收集。每一樣本皆進行三重複試驗，施加100 μ L至三測試裝置原型每一者之樣本孔中。

每一裝置皆具有Oxonica Nanoplex™ SERS奈米顆粒，使用Hamamatsu反射儀(模組C10066)偵測，於施加樣本後15分鐘與30分鐘。30分鐘後偵測，每一橫向流動直條係自卡匣中移出，塗佈該共軛與濕潤墊，並於室內溫度與濕度下乾燥至少1小時。每一直條皆於乾燥後以反射儀再偵測一次。劑量反應曲線係繪製出，使用來自每一偵測時間之資料，之後用於計算每一偵測時間之敏感度，換算為最小偵測濃度(每一平均訊號之最低濃度等於空白樣本信賴曲線之最大值；MDC)，以及可信賴偵測極限(RDL)。這些結果顯示於表4。表4亦顯示出使用Oxonica顆粒可使敏感度增進，與Directigen™ EZ相較。Directigen™ EZ使用不具二氧化矽塗覆物之40 nm-直徑金膠體。

表4. 卡匣基礎Flu A橫向流動試驗系統之敏感度，使用Oxonica SERS-活性奈米顆粒，並以反射儀偵測

裝置狀態與 偵測時間	Flu A 偵測極限，以反射 儀讀取(Oxonica顆粒)		RDL增進v.s. Directigen™ EZ Flu A裝置，以反射儀讀取
	MDC (X)	RDL (X)	
於15分鐘濕潤	0.0341	0.0666	3.0-倍
於30分鐘濕潤	0.0131	0.0264	7.6-倍
30分鐘後乾燥	0.0130	0.0242	8.3-倍
† 表示為最低偵測濃度(MDC)，以及可信賴偵測極限(RDL)			

目前Directigen™ EZ Flu A裝置之偵測極限(RDL)約為0.5X Flu A病毒濃度，以視覺判定，若以反射儀讀取則為0.2X。如表4所示，該使用Oxonica Nanoplex™ 報導子奈米顆粒之卡匣基礎測試裝置，係提供明顯增進之敏感度，相較於目前之Directigen™ EZ Flu A裝置。

範例6：

在此範例中，該橫向流動 Flu A試驗原型，使用Oxonica Nanoplex™經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒之分析級敏感度，係與BD Directigen™ EZ Flu A+B市售產品，具有反射儀，之分析級敏感度相較。該Oxonica顆粒具有直徑約60 nm之金核心，具有拉曼報導子分子4,4'-二吡啶聯結於該金表面，以及厚度約35 nm之二氧化矽外殼。在此範例中，每個橫向流動裝置中SERS奈米顆粒之量，經預估微小於市售產物中金膠體顆粒之量。BD Directigen™ EZ Flu A+B市售產物與Oxonica Nanoplex™ 奈米顆粒-基礎裝置所使用之捕捉與偵測抗體皆相同。

如同範例5所示，測試為A型流感病毒陰性之小兒科鼻咽抽出物樣本，係以已知量之活A型流感病毒產生刺突。經最佳化之原型裝置係如範例5中所述組裝，樣本萃取係依據BD Directigen™ EZ Flu A包裝說明進行。所有裝置(SERS-基礎原型與BD Directigen™ EZ Flu A+B)皆於樣本施加後15分鐘偵測，使用Hamamatsu反射儀(模組C10066)。第2圖顯示反射訊號為活病毒濃度之函數，就二試驗形式，表5顯示在最高測試病毒濃度(0.25X)下之反射儀訊號，伴隨該試

驗之可信賴偵測極限(RDL)。在此實驗中，使用SERS奈米顆粒之裝置可提供約7倍增進之敏感度，以及8倍增進之亮度，與BD Directigen™ EZ Flu A+B，以反射儀偵測，相較。

表5

	原型(使用Nanoplex™ SERS顆粒)	BD Directigen™ EZ A+B (使用金膠體)
RDL (不定)	0.027x	0.185x
反射度訊號強度， 於0.25x(不定單位)	0.419	0.054

等效範例

熟習此技術領域者應瞭解到或可考慮一般實驗流程中，有許多等效於此述特定實施例之等效實施例。此等效實施例亦包含於下列申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

第1圖顯示A型流感病毒之橫向流動試驗結果，係比較膠體金與經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒之敏感度，當以反射儀測量時。如圖中所示，經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒觀察到強烈的反應，與金膠體比較。

第2圖顯示顯示A型流感病毒之橫向流動試驗結果，係比較使用經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒之原型裝置敏感度(第2A圖)，以及商用產品，BD Directigen™ EZ A+B (第2B圖)之敏感度，此二裝置皆以反射儀讀取。使用經二氧化矽塗覆之金奈米顆粒之裝置敏感度約為BD Directigen™ EZ A+B之7倍，以反射儀讀取。

【主要元件符號說明】

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 98111807

G01N 33/68 (2006.01)

※ 申請日： 98.4.9

※IPC 分類：

G01N 33/569 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

G01N 33/53 (2006.01)

使用經塗覆奈米顆粒之敏感性免疫分析法

SENSITIVE IMMUNOASSAYS USING COATED NANOPARTICLES

二、中文發明摘要：

係提供一種經塗覆之奈米顆粒，包含一核心，由一可增加奈米顆粒反射度之外殼環繞，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一具拉曼(Raman)光譜活性分子。亦提供一種使用該經塗覆奈米顆粒之測試裝置與免疫試驗方法。

三、英文發明摘要：

Coated nanoparticles comprising a core surrounded by a shell that increases the reflectance of the nanoparticle, wherein the coated nanoparticle does not include a Raman-active molecule, are provided. Test devices and immunoassay methods utilizing the coated nanoparticles are provided.

七、申請專利範圍：

1. 一種測試裝置，用於測定在一液體樣本中分析物的存在或不存在，該裝置包含：(a) 一樣本接收元件；(b) 一載體，與該樣本接收元件呈液體連通；(c) 一標記試劑，在液體樣本存在下，該標記試劑於載體中為可移動，該標記試劑包含一與該分析物結合之配位體，以及一經塗覆之奈米顆粒，該奈米顆粒包含一核心以及一外殼，該外殼可增加具有配位體聯結於其上之奈米顆粒之反射度，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一具拉曼(Raman)光譜活性之分子；以及(d) 一結合試劑，可有效捕捉該分析物，當存在時，該結合試劑係被固定於載體之經定義偵測區域上；其中該液體樣本係施加於樣本接收元件上，使該標記試劑流動，使得該樣本與標記試劑可沿著載體長邊運送，到達該偵測區域，其中，若在偵測區域偵測到標記試劑，代表在該液體樣本中存在有分析物。
2. 如申請專利範圍第1項之測試裝置，其中該載體包含硝基纖維素、塑膠或玻璃。
3. 如申請專利範圍第2項之測試裝置，其中該載體包含硝基纖維素。
4. 如申請專利範圍第1項之測試裝置，其中該分析物為一蛋白質、核酸、代謝物、小分子、病毒或細菌。
5. 如申請專利範圍第1項之測試裝置，其更包含一吸收墊，與偵測區呈液體連通。
6. 如申請專利範圍第1項之測試裝置，其更包含一控制區

域，與偵測區呈液體連通。

7. 如申請專利範圍第1項之測試裝置，其中該液體樣本中分析物之存在可定量測定。
8. 如申請專利範圍第1項之測試裝置，其中該測試裝置係設置為可偵測多種分析物。
9. 如申請專利範圍第8項之測試裝置，其更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體可結合至不同分析物上，以及至少二偵測區域，用於偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
10. 一種系統，包含如申請專利範圍第1項之測試裝置，以及一反射儀，用以偵測在該測試裝置中標記試劑之存在。
11. 一種用於測定在一液體樣本中一分析物的存在或不存在之方法，包含：
 - a) 提供如申請專利範圍第1項之測試裝置；
 - b) 將該液體樣本與該測試裝置之樣本接收元件接觸；
 - c) 允許將該液體樣本施加於樣本接收元件上，以使該標記試劑流動，使得該液體樣本與標記試劑沿著載體長邊運送，到達偵測區域；
 - d) 藉由測量反射度來偵測在偵測區域中標記試劑的存在，其中在偵測區域若偵測到標記試劑，代表液體樣本中存在有該分析物；且在偵測區域若未偵測到標記試劑，代表液體樣本中不存在有該分析物。
12. 如申請專利範圍第11項之方法，其中係使用反射讀取儀

測定偵測區域之標記試劑。

13. 如申請專利範圍第11項之方法，其中該偵測區域內標記試劑係以目視測定。
14. 如申請專利範圍第11項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係經定量測定。
15. 如申請專利範圍第11項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。
16. 如申請專利範圍第15項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同之標記試劑之每一者。
17. 一種用於測定在一液體樣本中分析物的存在或不存在之方法，包含：
 - a) 提供一測試裝置，包含：(i)一樣本接收元件；(ii)一載體，與該樣本接收元件呈液體連通；以及(iii)一結合試劑，可有效捕捉該分析物，當存在時，該結合試劑係係固定於該載體之經定義偵測區域上；
 - b) 將該液體樣本與標記試劑混合，該標記試劑包含一可結合至分析物之配位體，以及一經塗覆之奈米顆粒，該奈米顆粒包含一核心以及一外殼，該外殼可增加具有配位體聯結於其上之奈米顆粒之反射度，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一具拉曼光譜活性分子；
 - c) 將b)之混合物與該測試裝置之樣本接收元件接觸；

d) 允許將b)之混合物施加於樣本接收元件上，沿著載體長邊運送以到達該偵測區域；

e) 藉由測量反射度來偵測在該偵測區域中標記試劑的存在，其中在偵測區域中若偵測到標記試劑，代表在該液體樣本中存在有該分析物；且在偵測區域中若未偵測到該標記試劑，代表在該液體樣本中不存在有該分析物。

18. 如申請專利範圍第17項之方法，其中係使用反射讀取儀測定偵測區域之標記試劑。
19. 如申請專利範圍第17項之方法，其中該偵測區域之標記試劑係以目視測定。
20. 如申請專利範圍第17項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。
21. 如申請專利範圍第17項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。
22. 如申請專利範圍第21項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
23. 一種測試裝置，用於測定在一液體樣本中分析物的存在或不存在，包含：(a) 一樣本接收元件；(b) 一載體，與該樣本接收元件呈液體連通；(c) 一標記試劑，在液體樣本存在下，該標記試劑於載體中為可移動，該標記試劑包含一與分析物結合之配位體，以及一經塗覆之奈

米顆粒，該奈米顆粒基本上係由一核心以及一外殼所構成，該外殼可增加具有配位體聯結於其上之奈米顆粒之反射度，其中該配位體係結合至該外殼之表面上；以及
(d) 一結合試劑，可有效捕捉該分析物，當存在時，該結合試劑係固定於該載體之經定義偵測區域；其中該液體樣本係施加於樣本接收元件上，使標記試劑流動，以使得該樣本與標記試劑可沿著載體長邊運送，到達該偵測區域，且其中，若在偵測區域中偵測到標記試劑，代表在該液體樣本中存在有分析物。

24. 如申請專利範圍第23項之測試裝置，其中該載體包含硝基纖維素、塑膠或玻璃。
25. 如申請專利範圍第24項之測試裝置，其中該載體包含硝基纖維素。
26. 如申請專利範圍第23項之測試裝置，其中該分析物為一蛋白質、核酸、代謝物、小分子、病毒或細菌。
27. 如申請專利範圍第23項之測試裝置，其更包含一吸收墊，與偵測區呈流體連通。
28. 如申請專利範圍第23項之測試裝置，其更包含一控制區域，與偵測區呈流體連通。
29. 如申請專利範圍第23項之測試裝置，其中該液體樣本中分析物之存在可定量測定。
30. 如申請專利範圍第23項之測試裝置，其中該測試裝置係設置為可偵測多種分析物。
31. 如申請專利範圍第30項之測試裝置，其更包含至少二不

同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。

32. 一種包含如申請專利範圍第23項之測試裝置，以及一反射儀之系統，用以偵測測試裝置中標記試劑之存在。

33. 一種用於測定在一液體樣本中分析物的存在或不存在之方法，包含：

a) 提供如申請專利範圍第23項之測試裝置；

b) 將該液體樣本與該測試裝置之樣本接收元件接觸；

c) 允許將該液體樣本施加於樣本接收元件上，使該標記試劑流動，以使得該液體樣本與標記試劑沿著載體長邊運送，到達偵測區域；

d) 藉由測量反射度來偵測在偵測區域中標記試劑的存在，其中在偵測區域若偵測到標記試劑，代表在該液體樣本中存在有分析物；且在該偵測區域若未偵測到該標記試劑，代表液體樣本中不存在有該分析物。

34. 如申請專利範圍第33項之方法，其中係使用反射讀取儀測定偵測區域之標記試劑。

35. 如申請專利範圍第33項之方法，其中該偵測區域中標記試劑係以目視測定。

36. 如申請專利範圍第33項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。

37. 如申請專利範圍第33項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。

38. 如申請專利範圍第37項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同之標記試劑之每一者。
39. 一種用於測定在一液體樣本中分析物的存在或不存在之方法，包含：
- a) 提供一測試裝置，包含：(i) 一樣本接收元件；(ii) 一載體，與該樣本接收元件呈液體連通；以及(iii) 一結合試劑，可有效捕捉該分析物，當存在時，該結合試劑係固定於該載體之經定義偵測區域；
 - b) 將該液體樣本與標記試劑混合，該標記試劑基本上係由一核心與一增加奈米顆粒反射度之外殼，以及一聯結至該外殼表面上之配位體所構成，該配位體係與該分析物結合，；
 - c) 將b)之混合物與該測試裝置之樣本接收元件接觸；
 - d) 允許將b)之混合物施加於樣本接收元件上，以沿著載體長邊運送，到達該偵測區域；
 - e) 藉由測量反射度來偵測在偵測區域中該標記樣本的存在，其中在偵測區域中若偵測到該標記試劑，代表在液體樣本中存在有該分析物；且在偵測區域中若未偵測到該標記試劑，代表在液體樣本中不存在有該分析物。
40. 如申請專利範圍第39項之方法，其中係使用反射讀取儀

測定偵測區域之標記試劑。

41. 如申請專利範圍第39項之方法，其中該偵測區域中標記試劑之偵測係以目視決定。
42. 如申請專利範圍第39項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。
43. 如申請專利範圍第39項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。
44. 如申請專利範圍第43項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
45. 一種用於測定在一液體樣本中一分析物的存在或不存在之方法，包含：
 - a) 提供一測試裝置，包含：
 - (i) 一樣本接收元件；
 - (ii) 一載體，與該樣本接收元件呈液體連通；
 - (iii) 一標記試劑，在該液體樣本存在下，該標記試劑於載體中為可移動，該標記試劑包含一與分析物結合之配位體、一經塗覆之奈米顆粒，該奈米顆粒包含一核心、一聯結至該核心並可藉由表面強化拉曼散射產生訊號之分子，以及一環繞該核心與該分子之外殼，該外殼具有配位體聯結於其上；以及
 - (iv) 一結合試劑，可有效捕捉該分析物，當存在時，該結合試劑係固定於載體之經定義偵測區域；
 - b) 將該液體樣本與該測試裝置之樣本接收元件接觸；

c) 允許將該液體樣本施加於樣本接收元件上，使該標記試劑流動，以使得該液體樣本與標記試劑可沿著載體長邊運送，到達偵測區域；

d) 藉由測量反射度來偵測在該偵測區域中該標記樣本的存在，其中在該偵測區域中若偵測到該標記試劑，代表在該液體樣本中存在有該分析物；且在該偵測區域中若未偵測到該標記試劑，代表在該液體樣本中不存在有該分析物。

46. 如申請專利範圍第45項之方法，其中係使用反射讀取儀測定偵測區域之標記試劑。

47. 如申請專利範圍第45項之方法，其中該偵測區域內標記試劑係以目視測定。

48. 如申請專利範圍第45項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。

49. 如申請專利範圍第45項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。

50. 如申請專利範圍第49項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。

51. 一種用於測定在一液體樣本中一分析物存在或不存在之方法，包含：

- a) 提供一測試裝置，包含：(i) 一樣本接收元件；
- (ii) 一載體，與該樣本接收元件呈液體連通；以及(iii)

一結合試劑，可有效捕捉該分析物，當存在時，該結合試劑係固定於該載體之經定義偵測區域；

b) 將該液體樣本與標記試劑混合，該標記試劑包含一與分析物結合之配位體、及一經塗覆之奈米顆粒，該奈米顆粒包含一核心、一聯結至該核心並可藉由表面強化拉曼散射產生訊號之分子，以及一環繞該核心與該分子之外殼，該外殼具有配位體聯結於其上；

c) 將b)之混合物與該測試裝置之樣本接收元件接觸；

d) 允許將b)之混合物施加於該樣本接收元件上，以沿著載體長邊移動，到達該偵測區域；

e) 藉由測量反射度來偵測在該偵測區域中該標記試劑的存在，其中在偵測區域中若偵測到標記試劑，代表在該液體樣本中存在有該分析物；且在該偵測區域中若未偵測到該標記試劑，代表在該液體樣本中不存在有該分析物。

52. 如申請專利範圍第51項之方法，其中係使用反射讀取儀測定偵測區域之標記試劑。
53. 如申請專利範圍第51項之方法，其中該偵測區域內標記試劑係以目視測定。
54. 如申請專利範圍第51項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。
55. 如申請專利範圍第51項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。

56. 如申請專利範圍第55項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
57. 一種用於進行一流式分析測試(flow-through analytical test)之套組，該套組係藉由反射法偵測在液體樣本中分析物存在或不存在，該套組包含：(a) 一測試裝置，包含一孔狀薄膜，其包含一上表面與下表面，以及一有效捕捉該分析物之結合試劑，當存在於該液體樣本中時，該結合試劑係附著於該孔狀薄膜之上表面或下表面；以及(b) 一標記試劑，包含一與分析物結合之配位體以及一經塗覆之奈米顆粒，該奈米顆粒包含一核心以及一可增加該奈米顆粒反射度之外殼，其中該經塗覆之奈米顆粒並不包括一拉曼光譜活性之分子。
58. 如申請專利範圍第57項之套組，其中至少一分析物為一蛋白質、核酸、代謝物、小分子、病毒或細菌。
59. 如申請專利範圍第57項之套組，其中該測試裝置更包含一吸收墊，其中該孔狀薄膜之下表面與吸收墊呈物理性接觸，並以流體連通，以及其中該結合試劑係附著至該孔狀薄膜之上表面。
60. 如申請專利範圍第57項之套組，其中該測試裝置更包含一孔狀薄膜之外罩。
61. 如申請專利範圍第57項之套組，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。

62. 如申請專利範圍第57項之套組，其中該測試裝置係設置為可偵測多種分析物。
63. 如申請專利範圍第62項之套組，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體可結合至不同分析物上，以及至少二偵測區域，可偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
64. 一種包含如申請專利範圍第57項之套組，以及一反射儀之系統，該系統係適用以偵測在測試裝置中標記試劑之存在。
65. 一種使用如申請專利範圍第57項之套組來測定在一液體樣本中分析物存在或不存在之方法，該方法包含：(a) 將該液體樣本與孔狀薄膜之上表面接觸；(b) 允許該液體樣本流過該孔狀薄膜，使得至少一部分之分析物在當存在於該液體樣本中時結合至該結合試劑上；(c) 將該標記試劑與該孔狀薄膜之上表面接觸；(d) 允許該標記試劑流過該孔狀薄膜，使得至少一部份之標記試劑結合至該分析物；以及(e) 藉由測量反射度來偵測該孔狀薄膜上該標記試劑之存在，其中該孔狀薄膜上若偵測到標記試劑，代表在該液體樣本中存在有該分析物；且該孔狀薄膜上若未偵測到標記試劑的存在，代表在該液體樣本中不存在有該分析物。
66. 如申請專利範圍第65項之方法，其中係使用反射讀取儀偵測孔狀薄膜上之標記試劑。
67. 如申請專利範圍第65項之方法，其中該孔狀薄膜上標記

試劑係以目視測定。

68. 如申請專利範圍第65項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。
69. 如申請專利範圍第65項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。
70. 如申請專利範圍第69項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
71. 一種使用如申請專利範圍第57項之套組來測定在一液體樣本中一分析物存在或不存在之方法，該方法包含：(a) 混合該液體樣本與該標記試劑，使得該分析物，當存在於該液體樣本中時，結合至該標記試劑；(b) 將(a)之混合物與孔狀薄膜之上表面接觸；(c) 允許(a)之混合物流過該孔狀薄膜，使得至少一部分已與標記試劑結合之分析物，結合至結合試劑上；以及(d) 藉由測量反射度來偵測孔狀薄膜上標記試劑之存在，其中該孔狀薄膜上若偵測到標記試劑，代表在該液體樣本中存在有該分析物；且在該孔狀薄膜上若未偵測到該標記試劑的存在，代表在該液體樣本中不存在有該分析物。
72. 如申請專利範圍第71項之方法，其中該反射讀取儀係用於測定孔狀薄膜上之標記試劑。
73. 如申請專利範圍第71項之方法，其中該孔狀薄膜上標記試劑係以目視測定。

74. 如申請專利範圍第71項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。
75. 如申請專利範圍第71項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。
76. 如申請專利範圍第75項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
77. 一種用於進行流式分析測試之套組，該套組係藉由反射法來偵測在該液體樣本中分析物存在或不存在，該套組包含：(a) 一測試裝置，包含一孔狀薄膜，其包含一上表面與下表面，以及一有效捕捉該分析物之結合試劑，當存在於該液體樣本中時，該結合試劑係附著於該孔狀薄膜之上表面或下表面；以及(b) 一標記試劑，包含一與該分析物結合之配位體以及經塗覆之奈米顆粒，該奈米顆粒基本上由一核心以及一增加該奈米顆粒反射度之外殼所構成，其中該配位體係結合至該外殼之表面。
78. 如申請專利範圍第77項之套組，其中該分析物為一蛋白質、核酸、代謝物、小分子、病毒或細菌。
79. 如申請專利範圍第77項之套組，其中該測試裝置更包含一吸收墊，其中該孔狀薄膜之下表面與該吸收墊呈物理性接觸，並以流體連通，以及其中該結合試劑係附著至該孔狀薄膜之上表面。
80. 如申請專利範圍第77項之套組，其中該測試裝置更包含

一孔狀薄膜之外罩。

81. 如申請專利範圍第77項之套組，其中該液體樣本中分析物之存在可定量測定。
82. 如申請專利範圍第77項之套組，其中該測試裝置係設置為可偵測多種分析物。
83. 如申請專利範圍第82項之套組，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體可結合至不同分析物上，以及至少二偵測區域，可偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
84. 一種包含如申請專利範圍第77項之套組以及一反射儀之系統，該系統係適用以偵測在測試裝置中標記試劑之存在。
85. 一種使用如申請專利範圍第77項之套組來測定在一液體樣本中分析物存在或不存在之方法，該方法包含：(a) 將該液體樣本與該孔狀薄膜之上表面接觸；(b) 允許該液體樣本流過該孔狀薄膜並進入吸收材料中，使得至少一部分之分析物在當存在於該液體樣本中時結合至該結合試劑上；(c) 將該標記試劑與該孔狀薄膜之上表面接觸；(d) 允許該標記試劑流過該孔狀薄膜並進入吸收材料，使得至少一部份之標記試劑可結合至該分析物上；以及(e) 藉由測量反射度來偵測在該孔狀薄膜上該標記試劑之存在，其中在該孔狀薄膜上若偵測到該標記試劑，代表在該液體樣本中存在有該分析物；且在該孔狀薄膜上若未偵測到該標記試劑的存在，代表在液體樣

本中不存在有該分析物。

86. 如申請專利範圍第85項之方法，其中係使用反射讀取儀測定孔狀薄膜上之標記試劑。
87. 如申請專利範圍第85項之方法，其中該孔狀薄膜上之標記試劑係以目視測定。
88. 如申請專利範圍第85項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。
89. 如申請專利範圍第85項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。
90. 如申請專利範圍第89項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
91. 一種使用如申請專利範圍第77項之套組來測定在一液體樣本中一分析物存在或不存在之方法，該方法包含：
 - (a) 混合該液體樣本與該標記試劑，使得該分析物在當存在於該液體樣本中時結合至該標記試劑；
 - (b) 將(a)之混合物與孔狀薄膜之上表面接觸；
 - (c) 允許(a)之混合物流過該孔狀薄膜，使得至少一部分已與該標記試劑結合之分析物，結合至該結合試劑上；以及
 - (d) 藉由測量反射度來偵測在該孔狀薄膜上標記試劑之存在，其中在該孔狀薄膜上若偵測到標記試劑，代表在該液體樣本中存在有該分析物；且在該孔狀薄膜上若未偵測到標記試劑的存在，代表在該液體樣本中不存在有該分析物。

92. 如申請專利範圍第91項之方法，其中係使用反射讀取儀測定孔狀薄膜上之標記試劑。
93. 如申請專利範圍第91項之方法，其中該孔狀薄膜上之標記試劑係以目視偵測。
94. 如申請專利範圍第91項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。
95. 如申請專利範圍第91項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。
96. 如申請專利範圍第95項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。
97. 一種進行流式分析測試之套組以用於藉由反射法來偵測在一液體樣本中一分析物存在或不存在，包含：(a) 一測試裝置，包含一孔狀薄膜，其包含一上表面與下表面，以及一有效捕捉該分析物之結合試劑，當存在於液體樣本中時，該結合試劑係附著於該孔狀薄膜之上表面或下表面；以及(b) 一標記試劑，包含一與該分析物結合之配位體，以及一經塗覆之奈米顆粒，該奈米顆粒包含一核心、一聯結至核心且可藉由表面強化拉曼散射產生訊號之分子，以及一環繞該核心與該分子之外殼。
98. 如申請專利範圍第97項之套組，其中該分析物為一蛋白質、核酸、代謝物、小分子、病毒或細菌。
99. 如申請專利範圍第97項之套組，其中該測試裝置更包含

一吸收墊，其中該孔狀薄膜之下表面與吸收墊呈物理性接觸，並以流體連通，以及其中該結合試劑係附著至該孔狀薄膜之上表面。

100.如申請專利範圍第97項之套組，其中該測試裝置更包含一孔狀薄膜之外罩。

101.如申請專利範圍第97項之套組，其中該液體樣本中分析物之存在可定量測定。

102.如申請專利範圍第97項之套組，其中該測試裝置係設置為可偵測多種分析物。

103.如申請專利範圍第102項之套組，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體可結合至不同分析物上，以及至少二偵測區域，可偵測該至少二不同標記試劑之每一者。

104.一種包含如申請專利範圍第97項之套組的測試裝置以及一反射儀之系統，該系統係適用以偵測在測試裝置中標記試劑之存在。

105.一種使用如申請專利範圍第97項之套組來測定在一液體樣本中分析物存在或不存在之方法，該方法包含：(a) 將該液體樣本與孔狀薄膜之上表面接觸；(b) 允許該液體樣本流過該孔狀薄膜並進入吸收材料，使得至少一部分之分析物在當存在於該液體樣本中時結合至該結合試劑上；(c) 將該標記試劑與該孔狀薄膜之上表面接觸；(d) 允許該標記試劑流過該孔狀薄膜並進入吸收材料，使得至少一部份之標記試劑結合至分析物上；以及

(e) 藉由測量反射度來偵測在該孔狀薄膜上該標記試劑之存在，其中該孔狀薄膜上若偵測到標記試劑，代表在該液體樣本中存在有該分析物；且在該孔狀薄膜上若未偵測到該標記試劑的存在，代表在該液體樣本中不存在有該分析物。

106.如申請專利範圍第105項之方法，其中係使用反射讀取儀測定孔狀薄膜上之標記試劑。

107.如申請專利範圍第105項之方法，其中該孔狀薄膜上之標記試劑係以目視測定。

108.如申請專利範圍第105項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。

109.如申請專利範圍第105項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。

110.如申請專利範圍第109項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。

111.一種使用如申請專利範圍第97項之套組來測定在一液體樣本中一分析物存在或不存在之方法，該方法包含：

(a) 混合該液體樣本與標記試劑，使得該分析物在當存在於該液體樣本中時與該標記試劑結合；(b) 將(a)之混合物與孔狀薄膜之上表面接觸；(c) 允許(a)之混合物流過該孔狀薄膜，使得至少一部分已與標記試劑結合之分析物，結合至該結合試劑上；以及(d) 藉由測量反射度

來偵測在該孔狀薄膜上該標記試劑之存在，其中在該孔狀薄膜上若偵測到該標記試劑，代表在該液體樣本中存在有該分析物；且在該孔狀薄膜上若未偵測到標記試劑的存在，代表在該液體樣本中不存在有該分析物。

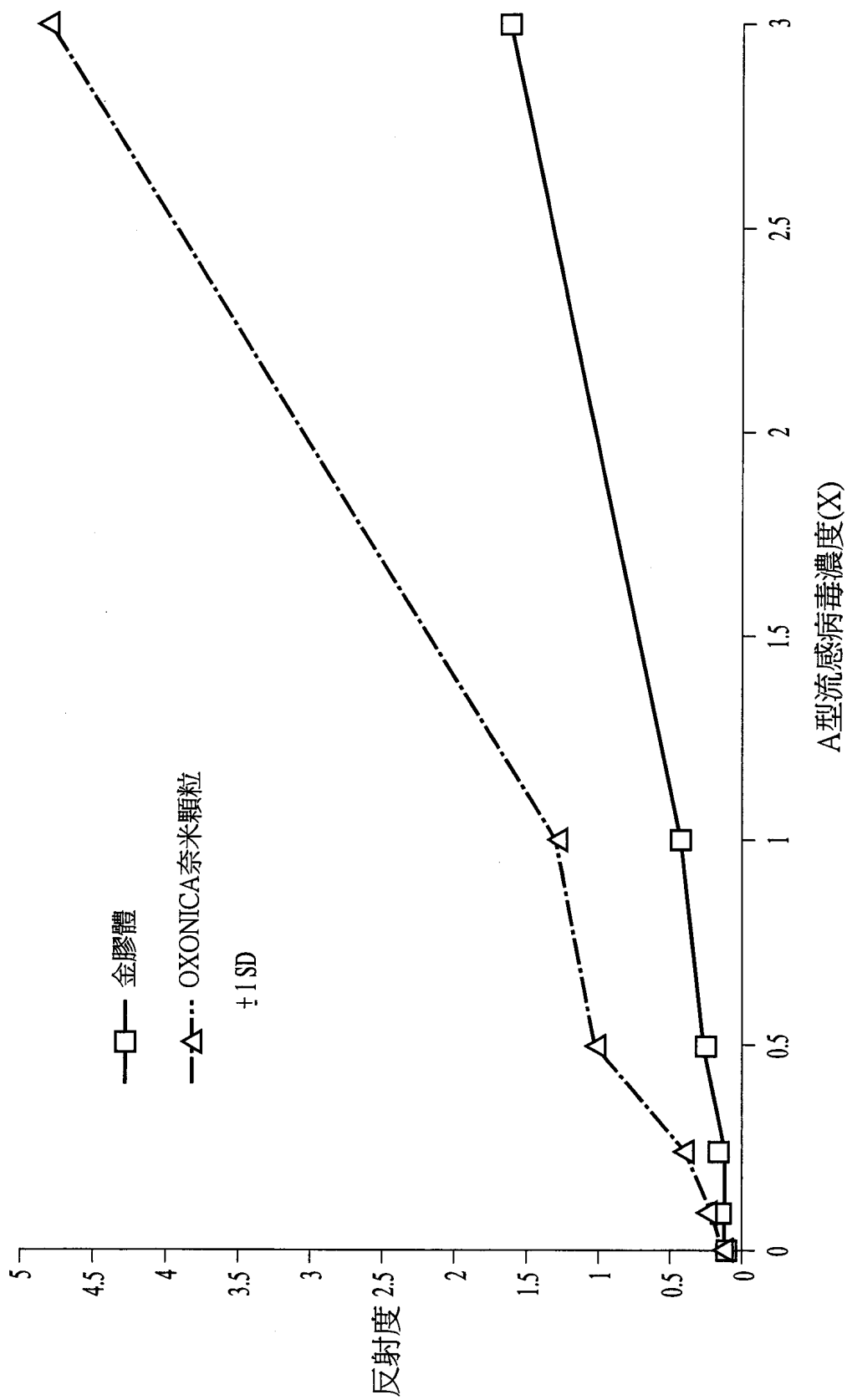
112.如申請專利範圍第111項之方法，其中係使用反射度讀取儀測定孔狀薄膜上之標記試劑。

113.如申請專利範圍第111項之方法，其中該孔狀薄膜上之標記試劑係以目視測定。

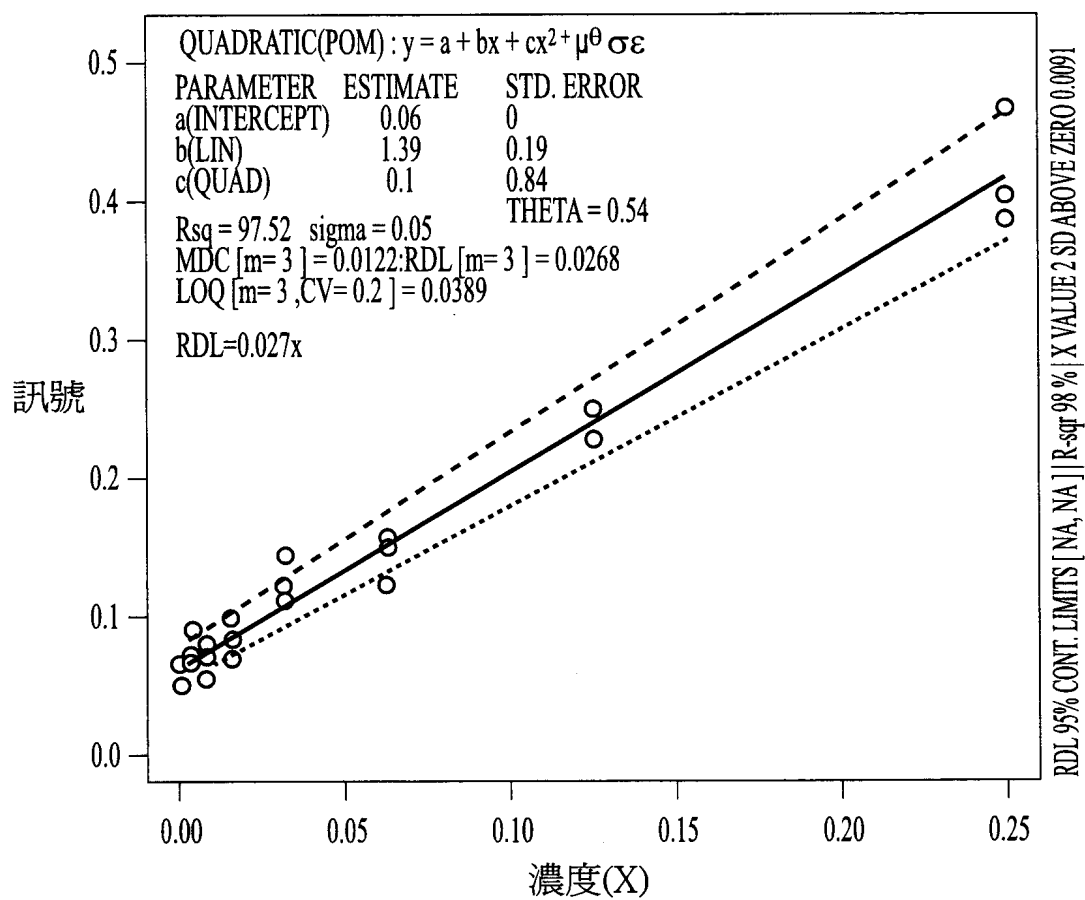
114.如申請專利範圍第111項之方法，其中該液體樣本中分析物之存在係定量測定。

115.如申請專利範圍第111項之方法，其中該方法可偵測液體樣本中之多種分析物。

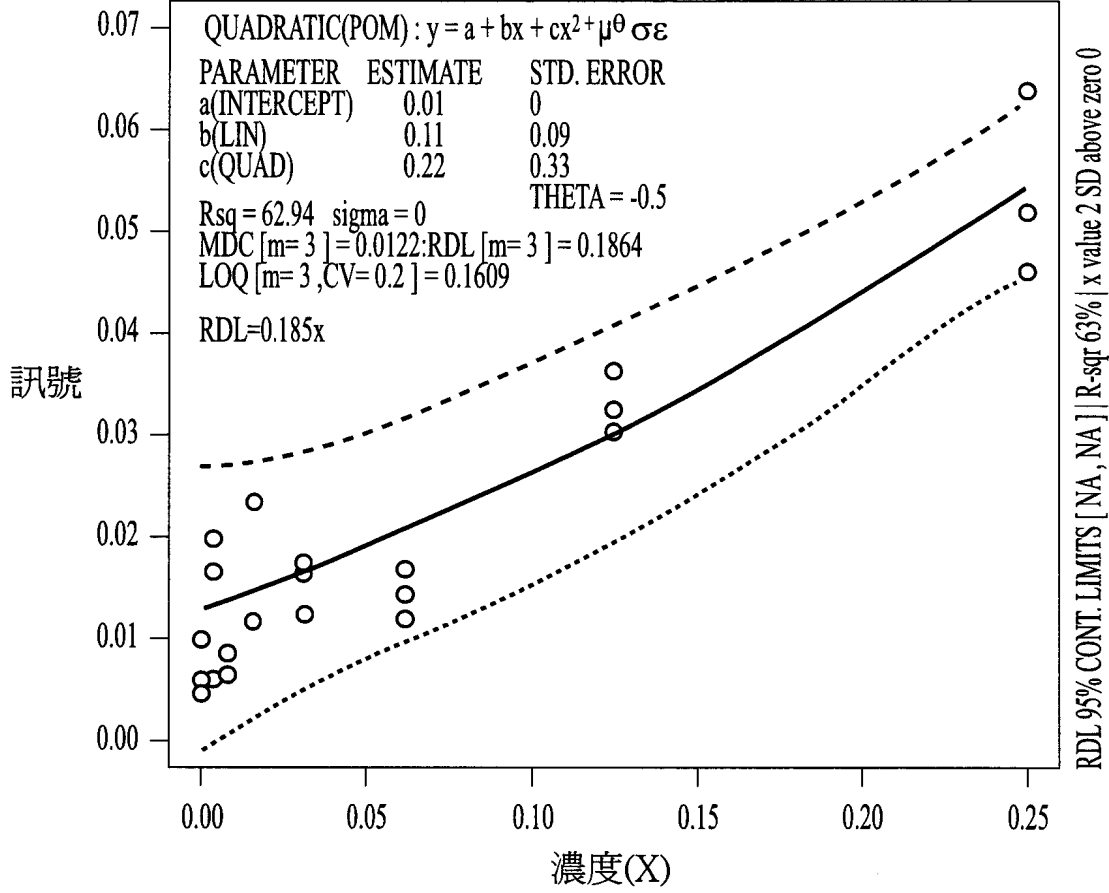
116.如申請專利範圍第115項之方法，其中該測試裝置更包含至少二不同之標記試劑，其中該標記試劑之配位體會結合至不同分析物上，以及至少二偵測區，用以偵測該至少二不同標記試劑之每一者。



第1圖



第 2A 圖



第 2B 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)