



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년11월12일
(11) 등록번호 10-0994316
(24) 등록일자 2010년11월08일

- (51) Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2005-7002262
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2003년06월05일
심사청구일자 2008년03월10일
- (85) 번역문제출일자 2005년02월07일
- (65) 공개번호 10-2005-0062528
- (43) 공개일자 2005년06월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2003/018058
- (87) 국제공개번호 WO 2004/021003
국제공개일자 2004년03월11일
- (30) 우선권주장
10/228,837 2002년08월27일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
US5466574 A*
EP0724156 A
Clinical Chemistry Vol.45(1):92-97
*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, 세동
미국 30076 조지아주 로즈웰 크랩애플 레이크 서
클 1135
케일러, 로잔
미국 30041 조지아주 커밍 윌리엄스버그 드라이브
7480
- (74) 대리인
장수길, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 31 항

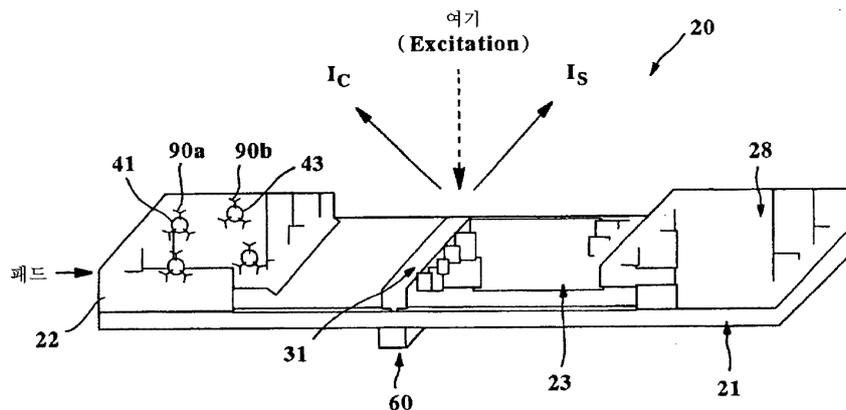
심사관 : 안규정

(54) 자기 결합 분석용 자가-교정 시스템

(57) 요약

시험 샘플 내의 분석물의 존재 또는 양을 검출하기 위한 자가-교정된 자기 결합 분석 시스템 (샌드위치, 경쟁 등)이 제공된다. 자기 결합 분석 시스템은 검출 시그널을 생성시킬 수 있는 검출 프로브 (형광 비자기 입자) 및 교정 시그널을 생성시킬 수 있는 교정 프로브 (형광 자기 입자)를 포함한다. 시험 샘플 내의 분석물의 양은 교정 시그널의 강도에 의해 교정된 검출 시그널의 강도에 비례한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

검출 시그날을 생성시킬 수 있는 검출 프로브 및 교정 시그날을 생성시킬 수 있는 자기 교정 프로브를 포함하며, 시험 샘플 내의 분석물의 양이 교정 시그날의 강도에 의해 교정된 검출 시그날의 강도에 비례하는 것인, 시험 샘플 내의 분석물의 존재 또는 양을 검출하기 위한 자가-교정된 자기 결합 분석 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 검출 프로브, 상기 교정 프로브 또는 이들의 조합물이 특이적 결합 성분에 컨쥬게이션된 것인 분석 장치.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 특이적 결합 성분이 항원, 합텐, 앵타머 (aptamer), 항체 및 이들의 복합체로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 분석 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 검출 프로브 및 상기 교정 프로브가 형광 화합물, 화학발광 화합물, 인광 화합물 및 이들의 조합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 분석 장치.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 검출 프로브 및 상기 교정 프로브가 형광 화합물인 분석 장치.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 형광 화합물이 입자인 분석 장치.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 검출 프로브가 형광 비자기 화합물인 분석 장치.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 교정 프로브가 형광 자기 입자인 분석 장치.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형광 자기 입자가 특이적 결합 성분에 컨쥬게이션된 것인 분석 장치.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 형광 자기 입자가 차단된 것인 분석 장치.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 검출 프로브가 분석물에 결합할 수 있는 것인 분석 장치.

청구항 12

제1항에 있어서, 비형광 자기 입자를 추가로 포함하는 것인 분석 장치.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 비형광 자기 입자가 분석물에 결합할 수 있는 것인 분석 장치.

청구항 14

제1항에 있어서, 시험 샘플 내의 분석물의 양이 검출 시그날의 강도를 교정 시그날의 강도로 나눈 값에 비례하는 것인 분석 장치.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 프로브는 형광 비자기 입자를 함유하고, 교정 프로브는 형광 자기 입자를 함유하는 분석 장치.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

- i) 검출 시그날을 생성시킬 수 있는 검출 프로브 및 교정 시그날을 생성시킬 수 있는 자기 교정 프로브를 포함하는 자기 결합 분석 장치를 제공하는 단계,
- ii) 분석물을 포함하는 시험 샘플을 상기 검출 프로브 및 상기 교정 프로브와 접촉시키는 단계,
- iii) 자기 장치를 사용하여 상기 검출 프로브 및 상기 교정 프로브를 시험 샘플로부터 분리하는 단계,
- iv) 상기 분리된 검출 프로브 및 상기 분리된 교정 프로브를 여기시켜, 상기 분리된 검출 프로브가 검출 시그날을 방출하고 상기 분리된 교정 프로브가 교정 시그날을 방출하는 단계,
- v) 검출 시그날의 강도 및 교정 시그날의 강도를 측정하는 단계 및
- vi) 검출 시그날의 강도를 교정 시그날의 강도와 비교하는 단계를 포함하며, 시험 샘플 내의 분석물의 양이 교정 시그날의 강도에 의해 교정된 검출 시그날의 강도에 비례하는 것인 시험 샘플 내의 분석물의 존재 또는 양을 검출하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 검출 프로브 및 상기 교정 프로브가 형광성인 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 검출 프로브 및 상기 교정 프로브가 화학발광성인 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 검출 프로브 및 상기 교정 프로브가 인광성인 방법.

청구항 27

제23항에 있어서, 상기 검출 시그날이 제1 방출 파장에서 측정되는 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 교정 시그날이 제2 방출 파장에서 측정되는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 제1 방출 파장이 상기 제2 방출 파장과 상이한 것인 방법.

청구항 30

제23항에 있어서, 상기 검출 프로브가 비자성인 방법.

청구항 31

제23항에 있어서, 교정 시그날의 강도에 의해 교정된 검출 시그날의 강도를 복수의 소정의 분석물 농도에 대해 플로팅함으로써 교정 곡선을 생성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 32

제23항에 있어서, 상기 분석이 샌드위치-타입 분석인 방법.

청구항 33

제23항에 있어서, 상기 분석이 경쟁-타입 분석인 방법.

청구항 34

제23항에 있어서, 상기 분리된 검출 프로브 및 상기 분리된 교정 프로브가 동시에 여기되는 것인 방법.

청구항 35

제23항에 있어서, 검출 시그날 및 교정 시그날의 강도가 동시에 측정되는 것인 방법.

청구항 36

제1항에 있어서, 상기 검출 프로브 또는 상기 교정 프로브, 또는 상기 검출 프로브 및 상기 교정 프로브 모두를 시험 샘플로부터 분리할 수 있는 자기 장치를 추가로 포함하는 분석 장치.

청구항 37

제1항에 있어서, 상기 검출 프로브 또는 상기 교정 프로브, 또는 상기 검출 프로브 및 교정 프로브 모두를 여기시킬 수 있는 여기 수단을 추가로 포함하는 분석 장치.

청구항 38

제1항에 있어서, 시험 샘플 내의 분석물의 양을 평가할 수 있는 평가 수단을 추가로 포함하는 분석 장치.

명세서

배경기술

[0001] 시험 샘플에 분석물의 존재 및(또는) 부재를 결정하기 위한 분석에 상이한 분석 방법 및 장치가 통상 사용된다. 예를 들어, 면역분석은 유기체에 병원성이거나 외래 물질인 항원의 존재에 반응하여 항체가 생성되는 면역 시스템의 메커니즘을 이용한다. 상기 항체 및 항원, 즉 면역반응물은 서로 결합할 수 있고, 이에 의해 생물학적 샘플 내의 특정 항원의 존재 또는 농도를 결정하기 위해 사용할 수 있는 고특이성의 반응 메커니즘을 생성시킨다.

[0002] 분석물을 분석 방법에 의해 검출할 수 있도록 검출가능한 성분으로 표지된 면역반응물을 이용하는 다수의 공지

된 면역분석 방법이 존재한다. 예를 들어, "샌드위치-타입 (sandwich-type)" 분석은 대체로 시험 샘플을 분석물에 대한 항체와 혼합하는 것을 수반한다. 상기 항체는 이동성이고, 표지 또는 프로브, 예를 들어 염료 처리된 라텍스, 콜로이드성 금속 줄 또는 방사성 동위원소에 연결된다. 상기 혼합물은 이어서 분석물에 대한 고정 항체의 밴드 또는 대역을 포함하는 크로마토그래피 매질과 접촉된다. 크로마토그래피 매질은 종종 계량봉 (dipstick)과 유사한 스트립의 형태이다. 분석물과 표지된 항체의 복합체가 크로마토그래피 매질 상의 고정 항체의 대역에 도달하면, 결합이 발생하고 결합된 표지된 항체는 대역에 편재된다. 이것은 분석물의 존재를 나타낸다. 상기 기술은 정량적 또는 반정량적 결과를 얻기 위해 사용할 수 있다. 상기 샌드위치-타입 분석의 일부 예는 미국 특허 제4,168,146호 (그루브 (Grubb) 등) 및 제4,366,241호 (톰 (Tom) 등)에 기재되어 있다.

[0003] 다른 기술은 "경쟁 (competitive)-타입" 분석이다. "경쟁-타입" 분석에서, 표지는 대체로 항체가 샘플에 존재하는 임의의 비표지된 분석물과 결합하기 위해 경쟁하는 표지된 분석물 또는 분석물-유사체이다. 경쟁 분석은 대체로 분석물, 예를 들어 각각 1가이고 하나의 항체 분자와만 결합할 수 있는 합텐의 검출에 사용된다. 경쟁 면역분석 장치의 예는 미국 특허 제4,235,601호 (도이치 (Deutsch) 등), 제4,442,204호 (리오타 (Liotta)) 및 제5,208,535호 (뷔홀러 (Buechler) 등)에 기재되어 있다.

[0004] 자기 결합 분석은 자기장에 의해 쉽게 조작될 수 있고 특수한 고가의 장비를 필요로 하지 않기 때문에 복합 샘플로부터 생물학적 물질중 (예를 들어, 단백질, 세포 및 미세유기체)의 분리를 위해 널리 사용되어 왔다. 이 방식으로, 자기 면역분석은 물질 중의 존재 여부를 결정하기 위한 신속하고 간단한 기술을 제공할 수 있다. 상기 분석에서, 색상 (흡수 및 반사율), 형광, 화학발광, 방사성 및 효소를 포함하여 상이한 시그널 생성 메커니즘이 사용되어 왔다.

[0005] 그러나, 종래의 자기 면역분석은 일반적으로 분석물에 대한 정량적 정보를 얻기 위해 사용될 때마다 교정 (calibration)곡선을 생성시키기 위한 대조 샘플을 필요로 한다. 구체적으로, 시험 샘플 내에 생물학적 물질중의 존재 여부를 분석할 때, 거의 동일한 조건에서 시험 분석을 교정하기 위해 다수의 대조 샘플을 물질중의 기지량에 대해 동시에 시험한다. 불운하게도, 상기 교정 기술은 종종 불편하고, 비용이 많이 소요되고, 번거롭다.

[0006] 따라서, 조절이 용이하고 비용이 비교적 적게 소요되는, 정확한 분석 교정 시스템에 대한 필요성이 현재 존재한다.

[0007] <발명의 요지>

[0008] 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 시험 샘플 내의 분석물의 존재 또는 양을 검출하기 위한 자기-교정된 자기 결합 분석 시스템 (샌드위치, 경쟁 등)이 개시된다. 자기 결합 분석 시스템은 검출 시그널을 생성시킬 수 있는 검출 프로브 및 교정 시그널을 생성시킬 수 있는 자기 교정 프로브를 포함하고, 시험 샘플 내의 분석물의 양은 교정 시그널의 강도에 의해 교정된 검출 시그널의 강도에 비례 (예를 들어 정비례 또는 반비례)한다. 일부 실시태양에서, 검출 프로브, 교정 프로브 또는 이들의 조합물은 특이적 결합 성분과 컨주게이션된다. 특이적 결합 성분은 예를 들어 항원, 합텐, 항체 및 이들의 복합체로 이루어지는 군 중에서 선택될 수 있다.

[0009] 일반적으로 말하면, 검출 프로브 및 교정 프로브는 검출가능한 시그널을 생성시킬 수 있는 임의의 물질로 형성될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 상기 프로브는 색원체, 촉매, 형광 화합물, 화학발광 화합물, 인광 화합물, 방사성 화합물, 직시 (direct visual) 표지, 리포솜 및 이들의 조합물로 이루어진 군 중에서 선택된다. 예를 들어, 검출 프로브 및 교정 프로브는 형광 화합물, 예를 들어 형광 입자일 수 있다. 한 특정 실시태양에서, 검출 프로브는 형광 비자기 화합물이고, 교정 프로브는 형광 자기 입자이다. 필요한 경우, 형광 자기 입자는 특이적 결합 성분과 컨주게이션되거나 차단될 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 시험 샘플 내의 분석물의 존재 또는 양을 검출하는 방법이 개시된다. 상기 방법은

[0011] i) 검출 시그널을 생성시킬 수 있는 검출 프로브 및 교정 시그널을 생성시킬 수 있는 자기 교정 프로브를 포함하는 자기 결합 분석 시스템을 제공하는 단계,

[0012] ii) 분석물을 포함하는 시험 샘플을 상기 검출 프로브 및 상기 교정 프로브와 접촉시키는 단계,

[0013] iii) 자기 장치를 사용하여 검출 프로브 및 교정 프로브를 시험 샘플로부터 분리하는 단계,

[0014] iv) 분리된 검출 프로브 (복합체화 및(또는) 비복합체화) 및 분리된 교정 프로브 (복합체화 및(또는) 비복합체화)를 여기(excitation)시켜, 분리된 검출 프로브가 검출 시그널을 방출하고 분리된 교정 프로브가 교정 시그널

을 방출하는 단계,

- [0015] v) 검출 시그날의 강도 및 교정 시그날의 강도를 측정하는 단계 및
- [0016] vi) 검출 시그날의 강도를 교정 시그날의 강도와 비교하는 단계 (여기서 시험 샘플 내의 분석물의 양은 교정 시그날의 강도에 의해 교정된 검출 시그날의 강도에 비례함)
- [0017] 를 포함한다.
- [0018] 따라서, 분리된 검출 및 교정 프로브 (복합체화 및(또는) 비복합체화)는 시험 샘플 내의 분석물의 존재 또는 양을 나타낼 수 있다. 구체적으로, 시험 샘플 내의 분석물의 양은 검출 대역에서 분리된 교정 프로브 (복합체화 및(또는) 비복합체화)에 의해 생성된 교정 시그날의 강도에 의해 교정된 검출 대역에서 분리된 검출 프로브 (복합체화 및(또는) 비복합체화)에 의해 생성된 검출 시그날의 강도에 비례한다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 시험 샘플 내의 분석물의 양은 검출 시그날의 강도를 교정 시그날의 강도로 나눈 값에 비례한다.
- [0019] 분리된 검출 프로브 및 교정 프로브는 동시에 또는 별개로 여기서킬 수 있다. 유사하게, 검출 시그날 및 교정 시그날의 강도는 동시에 또는 별개로 측정할 수 있다. 또한, 한 실시태양에서 상기 방법은 복수의 소정의 분석물 농도에 대해 교정 시그날의 강도에 의해 교정된 검출 시그날의 강도를 플로팅함으로써 교정 곡선을 생성시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0020] 본 발명의 다른 특징 및 측면은 이하에서 보다 상세하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

[0033] 정의

[0034] 본원에서 사용되는 용어 "분석물"은 일반적으로 검출되는 물질을 의미한다. 예를 들어, 분석물은 항원성 물질, 합텐, 항체 및 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 분석물은 독신, 유기 화합물, 단백질, 펩티드, 미세유기체, 아미노산, 핵산, 호르몬, 스테로이드, 비타민, 약물 (치료 목적으로 투여되는 약물 및 금지된 목적으로 투여되는 약물을 포함), 세균, 바이러스 입자 및 상기 임의의 물질의 대사산물 또는 상기 물질에 대한 항체를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 몇몇 분석물의 구체적인 예는 페리틴, 크레아티닌 키나제 MIB (CK-MB), 디곡신, 페니토인, 페노바르비탈, 카르바마제핀, 반코마이신, 겐타마이신, 테오필린, 발프로산, 퀴니딘, 혈청항색소화 호르몬 (LH), 난포 자극 호르몬 (FSH), 에스트라디올, 프로게스테론, IgE 항체, 비타민 B2 마이크로글로불린, 당화 헤모글로빈 (Gly. Hb), 코르티졸, 디기톡신, N-아세틸프로카인아미드 (NAPA), 프로카인아미드, 풍진에 대한 항체, 예를 들어 풍진-IgG 및 풍진 IgM, 주혈원충증에 대한 항체, 예를 들어 주혈원충증 IgG (Toxo-IgG) 및 주혈원충증 IgM (Toxo-IgM), 테스토스테론, 살리실레이트, 아세트아미노펜, B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg), B형 간염 코어 항원에 대한 항체, 예를 들어 B형 간염 코어 항원 IgG 및 IgM (항-HBC), 인간 면역 결핍 바이러스 1 및 2 (HIV 1 및 2), 인간 T-세포 백혈병 바이러스 1 및 2 (HTLV), Be형 간염 항원 (HBeAg), Be형 간염 항원에 대한 항체 (항-HBe), 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 티록신 (T4), 총 트리요오도티로닌 (총 T3), 유리 트리요오도티로닌 (유리 T3), 태아성암 항원 (CEA) 및 알파 태아 단백질 (AFP)을 포함한다. 남용 약물 및 통제 물질은 암페타민, 메탐페타민, 바르비투레이트, 예를 들어 아모바르비탈, 세코바르비탈, 펜토바르비탈, 페노바르비탈 및 바르비탈, 벤조디아제핀, 예를 들어 리브륨 및 발륨, 칸나비노이드, 예를 들어 해시시 및 마리화나, 코카인, 펜타닐, LSD, 메타쿠알론, 진정제, 예를 들어 헤로인, 몰핀, 코데인, 히드로모르폰, 히드로코돈, 메타돈, 옥시코돈, 옥시모르폰 및 아편, 펜시클리딘 및 프로폭시헨을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 다른 잠재적인 분석물은 미국 특허 제4,366,241호 (툼 등)에 기재되어 있다.

[0035] 본원에서 사용되는 용어 "시험 샘플"은 일반적으로 분석물을 포함하는 것으로 의심되는 물질을 의미한다. 시험 샘플은 공급원으로부터 입수한 상태로 직접 사용하거나 샘플의 특성을 변경시키기 위해 전처리한 후에 사용할 수 있다. 시험 샘플은 임의의 생물학적 공급원, 예를 들어 혈액, 타액, 안 렌즈액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 유즙, 복수 유체, 점액, 활액, 복막액, 양막액 등을 포함하는 생리학적 유체로부터 유래할 수 있다. 시험 샘플은 사용 전에 예를 들어 혈액으로부터 혈장의 제조, 점액의 희석 등과 같이 전처리될 수 있다. 처리 방법은 저해 성분의 여과, 증류, 농축, 불활성화 및 시약의 첨가를 수반할 수 있다. 생리학적 유체 이외에, 다른 액체 샘플, 예를 들어 환경 또는 식품 제조 분석을 수행하기 위한 물, 식품 등을 사용할 수 있다. 또한, 분석물을 포함하는 것으로 의심되는 고체 물질을 시험 샘플로서 사용할 수 있다. 일부 경우에, 액체 매질을 형성하거나 분석물을 방출시키기 위해서 고체 시험 샘플을 변형시키는 것이 유리할 수 있다.

[0036] 그의 하나 이상의 예가 아래에 제시되는 본 발명의 상이한 실시태양을 참고로 하여 보다 상세하게 설명한다.

각각의 실시예는 본 발명을 설명하기 위해 제시된 것으로서 본 발명을 제한하는 것이 아니다. 실제로, 당업계의 숙련인은 본 발명의 범위 및 취지를 벗어나지 않는 상이한 변형 및 변경을 가할 수 있음을 알 것이다. 예를 들어, 한 실시태양의 일부로서 예시되거나 설명된 특징은 다른 실시태양을 설명하기 위해서 다른 실시태양에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 첨부된 특허청구 범위 및 그의 균등물에 포함되는 상이 변형 및 변경을 포함하는 것으로 의도된다.

- [0037] 일반적으로, 본 발명은 시험 샘플 내의 분석물의 존재 또는 양을 검출하기 위한 자가-교정된 자기 결합 분석 시스템 (예를 들어 샌드위치, 경쟁 등)에 관한 것이다. 상기 자기 결합 분석 시스템은 검출 시그널을 생성시킬 수 있는 검출 프로브 (예를 들어, 형광 비자기 입자) 및 교정 시그널을 생성시킬 수 있는 교정 프로브 (예를 들어 형광 자기 입자)를 포함한다. 시험 샘플 내의 분석물의 양은 교정 시그널의 강도에 의해 교정된 검출 시그널의 강도에 비례 (예를 들어 정비례 또는 반비례)한다. 본 발명의 자가-교정 시스템은 시험 샘플 내의 분석물의 존재를 결정하는, 정확하고 저비용의 쉽게 제어가능한 방법을 제공한다.
- [0038] 도 1 및 2를 참고로 하여, 예를 들어 본 발명에 따라 형성될 수 있는 유동 샌드위치 분석 시스템 (20)의 한 실시태양을 아래에서 보다 상세하게 설명한다. 도시된 바와 같이, 분석 시스템 (20)은 경질 물질 (21)에 의해 임의로 지지된 다공성 막 (23)을 포함한다. 일반적으로, 다공성 막 (23)은 시험 샘플이 그를 통과할 수 있는 다양한 물질로 형성될 수 있다. 예를 들어, 다공성 막 (23)을 형성하기 위해 사용되는 물질은 천연, 합성 또는 합성에 의해 개질된 천연 물질, 예를 들어 폴리사카라이드 (예를 들어 셀룰로스 물질, 예를 들어 종이 및 셀룰로스 유도체, 예를 들어 셀룰로스 아세테이트 및 니트로셀룰로스), 실리카, 중합체, 예를 들어 비닐 클로라이드, 비닐 클로라이드-프로필렌 공중합체 및 비닐 클로라이드-비닐 아세테이트 공중합체와 함께 다공성 중합체 매트릭스에 균일하게 분산된 무기 물질, 예를 들어 실활 알루미늄, 규조토, MgSO₄, 또는 다른 무기 미분 물질, 천연 식물 (예를 들어 면) 및 합성 식물 (예를 들어 나일론 또는 레이온), 다공성 겔, 예를 들어 실리카 겔, 아가로스, 텍스트란 및 젤라틴, 중합체 필름, 예를 들어 폴리아크릴아미드 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 한 특정 실시태양에서, 다공성 막 (23)은 니트로셀룰로스 및(또는) 폴리에스테르 술폰 물질로 형성된다. 용어 "니트로셀룰로스"는 셀룰로스의 질산 에스테르를 의미하고, 니트로셀룰로스 단독 또는 질산 및 다른 산, 예를 들어 탄소수 1 내지 7의 지방족 카르복실산의 혼합 에스테르일 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0039] 분석 시스템 (20)은 또한 위킹 패드 (28)을 포함할 수 있다. 위킹 패드 (28)은 일반적으로 전체 다공성 막 (23)을 통해 이동하는 유체를 수용한다. 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이, 위킹 패드 (28)은 막 (23)을 통한 모세관 작용 및 유체 유동 촉진을 도울 수 있다.
- [0040] 시험 샘플 내의 분석물의 검출을 개시하기 위해서, 사용자는 시험 샘플을 그를 통해 하나 이상의 검출 및 교정 대역 (아래에서 설명함)에 도달할 수 있는 다공성 막 (23)의 일부에 직접 적용할 수 있다. 별법으로, 시험 샘플을 다공성 막 (23)과 유체 소통하는 샘플링 패드 (도시하지 않음)에 먼저 적용할 수 있다. 샘플링 패드 형성에 사용될 수 있는 몇몇 적합한 물질은 니트로셀룰로스, 셀룰로스, 다공성 폴리에틸렌 패드 및 유리 섬유 여과지를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 필요한 경우, 샘플링 패드는 또한 확산 또는 비확산에 의해 부착된 하나 이상의 분석 전처리 시약을 포함할 수도 있다.
- [0041] 예시된 실시태양에서, 시험 샘플은 샘플링 패드 (도시하지 않음)로부터 샘플링 패드의 한 말단에 유체 소통하게 배치된 컨จู게이트 패드 (22)로 이동한다. 컨จู게이트 패드 (22)는 시험 샘플이 그를 통과할 수 있는 물질로 형성된다. 예를 들어, 한 실시태양에서 컨จู게이트 패드 (22)는 유리 섬유로 형성된다. 단지 하나의 컨จู게이트 패드 (22)가 도시되었지만, 다른 컨จู게이트 패드도 본 발명에 사용할 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0042] 시험 샘플 내의 분석물의 존재 검출을 용이하게 하기 위해서, 상이한 검출 프로브 (41)이 컨จู게이트 패드 (22)에 적용될 수 있다. 상기 프로브 (41)은 컨จู게이트 패드 (22) 상에 포함되지만, 샘플링 패드로부터 컨จู게이트 패드 (22)를 통과할 때 분석물과 결합할 수 있는 상태로 존재한다. 분석물과 결합시에, 프로브 (41)은 추후에 분석물의 존재 또는 부재를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 검출 프로브 (41)은 장치 (20)의 검출과 교정 모두를 위해 사용될 수 있다. 그러나, 다른 실시태양에서 교정과 검출의 동시 수행을 촉진시킴으로써 종래의 분석 교정 시스템에 의해 종종 발생하는 부정확성을 제거하기 위해 검출 프로브 (41)과 함께 사용하기 위해 별개의 교정 프로브 (43)이 컨จู게이트 패드 (22)에 첨가될 수 있다. 그러나, 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)은 장치 (20)의 임의의 위치에서 함께 또는 별개로 첨가될 수 있고, 컨จู게이트 패드 (22)에 적용될 필요가 없음을 이해하여야 한다. 또한, 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)을 동일한 또는 상이한 컨จู게이트 패드에 적용할 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0043] 가시적으로 또는 다른 도구 장치에 의해 검출가능한 시그널을 일반적으로 생성시킬 수 있는 임의의 물질이 검출

프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)으로서 사용될 수 있다. 상이한 적합한 물질은 콜로이드성 금속 (예를 들어 금) 및 비금속 입자, 염료 입자, 효소 또는 기질, 또는 유기 중합체 라텍스 입자, 리포솜 또는 시그널 생성 물질을 포함하는 다른 베지클을 포함하여 색원체, 촉매, 형광 화합물, 화학발광 화합물, 인광 화합물, 방사성 화합물, 직시 표지 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 프로브로서 적합한 일부 효소는 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제4,275,149호 (리트만 (Litman) 등)에 기재되어 있다. 효소/기질 시스템의 일례는 효소 알칼린 포스파타제 및 기질 니트로 블루 테트라졸륨-5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트, 또는 그의 유도체 또는 유사체, 또는 기질 4-메틸움벨리페릴-포스페이트이다. 다른 적합한 프로브는 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제5,670,381호 (조우 (Jou) 등) 및 제5,252,459호 (타르차 (Tarcha) 등)에 기재되어 있다.

[0044] 일부 실시태양에서, 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)은 검출가능한 시그널을 생성하는 형광 화합물을 포함할 수 있다. 형광 화합물은 형광 분자, 중합체, 덴드리머, 입자 등일 수 있다. 적합한 형광 분자의 몇몇 예는 예를 들어 플루오레세인, 유로퓸 킬레이트, 피코빌린 단백질, 로다민 및 이들의 유도체 및 유사체를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 또한, 몇몇 시판되는 적합한 형광 입자의 예는 몰레큘라 프로브스, 인크. (Molecular Probes, Inc.)에서 상표명 "FluoSphere" (Red 580/605) 및 "TransFluoSphere" (543/620)으로 시판하는 형광 카르복실레이트화 미세구 및 "Texas Red" 및 5- 및 6-카르복시테트라메틸로다민을 포함한다.

[0045] 프로브에 시그널 생성 능력을 부여하기 위해 사용되는 기술에 상관없이, 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)은 자기 반응성 프로브인 것이 일반적으로 바람직하다. 일반적으로, 물질은 자기장의 인가에 의해 영향 받을 경우, 예를 들어 유인되거나 배척되거나 또는 검출가능한 자기 민감성 또는 유도성을 갖는 경우에 "자기 반응성" 또는 "자성"인 것으로 간주된다. 예를 들어, 프로브에 자기 특성을 부여하기 위해 사용될 수 있는 적합한 자기 반응성 물질의 몇몇 예는 상자성 물질, 초상자성 물질, 강자성 물질, 준강자성 물질 및 준자성 물질을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 구체적인 예는 금속, 예를 들어 철, 니켈, 코발트, 크롬, 망간 등, 란타나이드, 예를 들어 네오디뮴, 에르븀 등, 합금, 예를 들어 알루미늄, 니켈, 코발트, 구리 등의 자기 합금, 산화물, 예를 들어 산화제2철 (Fe_3O_4), 산화제1철 (Fe_2O_3), 산화크롬 (CrO_2), 산화코발트 (CoO), 산화니켈 (NiO_2), 산화망간 (Mn_2O_3) 등, 복합 물질, 예를 들어 페라이트 등, 및 고체 용액, 예를 들어 산화제2철을 갖는 마그네타이트 등이다.

[0046] 일부 실시태양에서, 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)은 형광 및 자성을 갖는다. 형광 자기 프로브는 일반적으로 당업계에 공지되어 있으며, 종종 자기 반응성 성분 및 형광 성분을 포함한다. 일부 실시태양에서, 예를 들어, 하나 이상의 형광 염료가 프로브를 형성하기 위해 자기 입자에 인가되지만, 다른 실시태양에서 형광 염료(들)은 자기 입자와 커플링된 비자기 입자에 인가될 수 있다. 적합한 형광 염료의 일부 예는 모노메틴 염료, 트리메틴 염료, 펜타메틴 염료, 퀴놀린 염료, 스쿠아르산계 염료 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 피리딘인 모노메틴 염료는 대체로 청색 또는 청녹색 형광 방출성이지만, 퀴놀린은 대체로 녹색 또는 황록색 형광 방출성이다. 트리메틴 염료는 적색 파장을 향하여 실질적으로 전환되지만, 펜타메틴 염료도 전환되어 종종 적외선 형광 방출을 보인다. 상기 형광 염료의 구체적인 예는 프탈로시아닌, 2,3-나프탈로시아닌, 스쿠아라인 및 크로콘산 유도체를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 적합한 형광 자기 입자의 다른 예는 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제4,731,337호 (루오톨라 (Luotola) 등) 및 제6,268,222호 (첸들러 (Chandler) 등)에 기재되어 있다.

[0047] 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)이 예를 들어 상기한 바와 같이 입자일 경우, 입자 프로브의 평균 직경은 일반적으로 여러 요인, 예를 들어 선택된 입자 종류, 막의 공극 크기 및 막 조성에 따라 요구되는 바와 같이 변할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 입자 프로브의 평균 직경은 약 0.01 미크론 내지 약 1,000 미크론, 일부 실시태양에서 약 0.01 미크론 내지 약 100 미크론, 일부 실시태양에서 약 0.01 미크론 내지 약 10 미크론일 수 있다. 한 특정 실시태양에서, 입자 프로브의 평균 직경은 약 1 내지 약 2 미크론이다. 일반적으로, 입자는 실질적으로 구형이지만, 판형, 막대형, 바형, 불규칙 형태 등을 포함하여 다른 형태도 본 발명에 사용하기 적합하다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 입자의 조성, 형태, 크기 및(또는) 밀도는 크게 상이할 수 있다.

[0048] 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)은 분석물에 결합 (공유 또는 비공유)하거나 또는 분석물을 물리적으로 흡착할 수 있다. 그러나, 프로브는 분석물에 보다 용이하게 결합할 수 있도록 특정 방식으로 개질시키는 것이 종종 바람직하다. 이 경우에, 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)은 자체에 부착되어 프로브 컨쥬게이트를 형성하는 특정한 특이적 결합 성분 (90a) 및(또는) (90b) (도 2 참조)로 개질될 수 있다.

- [0049] 특이적 결합 성분은 일반적으로 특이적 결합쌍, 한 분자가 다른 분자에 화학적으로 맞(또는) 물리적으로 결합하는 2개의 상이한 분자의 구성원을 의미한다. 예를 들어, 면역반응성 특이적 결합 성분은 재조합 DNA 방법 또는 펩티드 합성법에 의해 형성되는 것을 포함하여 항원, 합텐, 앵타머 (aptamer), 항체 및 이들의 복합체를 포함할 수 있다. 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체, 재조합 단백질 또는 이들의 혼합물(들) 또는 이들의 단편(들), 및 항체와 다른 특이적 결합 성분의 혼합물을 포함할 수 있다. 상기 항체의 제조 및 특이적 결합 성분으로서 사용하기 위한 적합성의 상세한 내용은 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다.
- [0050] 다른 통상적인 특이적 결합쌍은 비오틴 및 아비딘, 탄수화물 및 렉틴, 상보성 뉴클레오티드 서열 (표적 핵산 서열을 검출하기 위한 DNA 혼성화 분석에 사용되는 프로브 및 포획 핵산 서열 포함) 및 재조합 방법에 의해 형성되는 것을 포함하는 상보성 펩티드 서열, 이펙터 및 수용체 분자, 호르몬 및 호르몬 결합 단백질, 효소 코펙터 및 효소, 효소 저해제 및 효소 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 또한, 특이적 결합쌍은 본래의 특이적 결합 성분의 유사체인 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 분석물의 유도체 또는 단편, 분석물-유사체는 분석물과 공통적인 적어도 하나의 에피토프를 갖는 한 사용될 수 있다.
- [0051] 특이적 결합 성분 (90a) 및(또는) (90b)는 임의의 상이한 공지 기술을 사용하여 프로브 (41) 및(또는) (43)에 부착될 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합 성분 (90a) 및(또는) (90b)의 프로브 (41) 및(또는) (43) (예를 들어 미립자)에 대한 공유 결합에 의한 부착은 카르복실기, 아미노기, 알데히드기, 브로모아세틸기, 요오도아세틸기, 티올기, 에폭시기 및 다른 반응성 또는 연결 관능기, 및 그를 통해 단백질 커플링 반응을 수행할 수 있는 잔류 유리 라디칼 및 라디칼 양이온을 사용하여 달성할 수 있다. 또한, 미립자의 표면은 비교적 높은 표면 농도의 극성기를 포함할 수 있기 때문에 표면 관능기가 관능화된 공단량체로서 도입될 수도 있다. 또한, 특정 경우, 예를 들어 폴리(티오폴레)의 경우에 미립자 프로브가 합성 후에 종종 관능화되기 때문에 미립자는 추가로 개질할 필요없이 단백질과 직접 공유 결합할 수 있다. 예를 들어, 도 6에서 프로브를 공유결합에 의해 컨쥬게이션시키는 본 발명의 한 실시태양이 예시되어 있다. 도시된 바와 같이, 컨쥬게이션의 제1 단계는 카르보디이미드를 사용하여 프로브 표면 상의 카르복실기의 활성화이다. 제2 단계에서, 활성화된 카르복실산기는 항체의 아미노기와 반응하여 아미드 결합을 형성한다. 활성화 및(또는) 항체 커플링은 완충액, 예를 들어 포스페이트-완충염수 (PBS) (예를 들어, pH 7.2) 또는 2-(N-모르폴리노)에탄 술폰산 (MES) (예를 들어, pH 5.3)에서 발생할 수 있다. 도시된 바와 같이, 생성되는 프로브는 이어서 예를 들어 에탄올아민으로 차단하여 프로브 컨쥬게이트를 형성할 수 있다. 공유결합 이외에, 다른 부착 기술, 예를 들어 흡착도 본 발명에서 사용할 수 있다.
- [0052] 다시 도 1-2에서, 분석물을 포함하는 시험 샘플은 초기에 샘플링 패드에 적용될 수 있다. 샘플링 패드로부터, 시험 샘플은 이어서 컨쥬게이트 패드 (22)로 이동할 수 있고, 여기서 분석물은 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)과 혼합된다. 선택되는 프로브의 종류에 따라, 분석물은 검출 프로브 (41) 및(또는) 교정 프로브 (43)에 결합하여 복합체 (49)를 형성할 수 있다 (도 2 참조). 예를 들어, 한 실시태양에서, 분석물을 포함하는 시험 샘플은 (1) 제 1 결합 성분 (90a)와 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (41) 및 (2) 제2 결합 성분 (90b)와 컨쥬게이션된 형광 자기 입자 (43)과 혼합된다. 이 경우에, 분석물은 형광 비자기 입자 (41) 및 형광 자기 입자 (43)과 샌드위치 복합체 (49)를 형성한다. 또한, 컨쥬게이트 패드 (22)는 다공성 막 (23)과 유체 소통하기 때문에, 복합체 (49)는 컨쥬게이트 패드 (22)로부터 다공성 막 (23) 상에 존재하는 검출 대역 (31)로 이동할 수 있다.
- [0053] 검출 대역 (31)에서, 복합체 (49) 및 임의의 비결합된 컨쥬게이션된 형광 자기 입자 (43)은 이어서 자기 장치 (60)에 의해 포획되고, 통상적인 기술을 사용하여 샘플의 나머지로부터 분리된다. 예를 들어, 자기장 발생기를 사용하여 자기 반응성 프로브로부터 반응을 유도하는 자기장을 생성시킬 수 있다. 적합한 자기장 발생기는 영구자석 및 전자석을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 자기 분리 공정은 대체로 친화도 반응에 의해 분석물을 결합시키기 위해 액체 매질 내에서 자기입자와 샘플을 혼합한 후, 자기장을 인가하여 샘플 매질로부터 비결합된 자기 입자 및 분석물 복합체를 분리하는 것을 수반한다. 콜로이드성 입자를 제외하고, 전부는 아니지만 대부분의 자기 입자가 시간 경과에 따라 침강한다. 따라서, 액체 매질은 생체친화도 결합 반응이 발생하도록 충분한 시간 동안 입자를 현탁된 상태로 유지하기 위해 교반할 수 있다. 공지된 교반 방법의 예는 부분적으로 충전된 용기의 진탕, 와류 처리 (swirling), 진동, 회전, 이와 유사한 처리를 포함한다. 적합한 자기 분리 장치의 일부 시판되는 예는 미국 뉴욕주 레이크 석세스 소재의 다이날, 인크. (DynaI, Inc.)에서 제조한, 시험 매질을 유지하는 용기의 외부에 위치하는 영구자석을 이용하고 분리만을 제공하는 DynaI MPC 시리즈를 포함한다. 친화도 결합 반응을 위한 시험 매질에서 자기 입자의 혼합은 별개로 수행된다. 또한, 자기 입자를 포획하는 다른 방법은 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제5,200,084호 (리버티 (Liberti) 등), 제5,647,994호 (투나넨 (Tuunanen) 등), 제5,795,470호 (왕 (Wang) 등) 및 제6,033,574호 (시디아이 (Siddiai)에 기재되어 있다.

- [0054] 일단 포획된 후에, 복합체화 및 비복합체화 형광 자기 입자 (43) 및 복합체 (49)의 형광 시그날은 통상적인 기술을 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 한 실시태양에서 입자 (43) 및 복합체 (49)는 동일한 외부 공급원을 사용하여 여기시킬 수 있다. 이 실시태양에서, 공급원은 여기 파장의 방사선을 공급하여 입자 (43)이 복합체 (49)에 의해 방출되는 파장과 상이한 파장의 광을 방출하도록 만든다. 이에 의해 복합체 (49) 및 입자 (41)의 존재를 별개로 측정할 수 있다. 별법으로, 입자 (43) 및 복합체 (49)는 별개의 외부 공급원을 사용하여 별개로 측정할 수도 있다.
- [0055] 일반적으로, 형광은 특정 형광 화합물에서 발생하는 3단계 과정의 결과이다. 제1 단계에서, 에너지는 외부 공급원, 예를 들어 백열 램프 또는 레이저에 의해 공급되고, 형광 화합물에 의해 흡수되어 여기된 전자 단일항 (singlet) 상태를 생성시킨다. 제2 단계에서, 여기 상태는 형광 화합물이 형태적 변화를 거치는 한정된 시간 동안 존재하고, 그의 분자 환경과 가능한 다수의 상호작용을 거친다. 이 동안에, 여기 상태의 에너지는 부분적으로 소실되고, 형광 방출이 그로부터 시작된 이완 상태를 생성시킨다. 제3 단계는 에너지가 방출되어 형광 화합물이 그의 바닥 상태로 복귀하는 형광 방출 단계이다. 방출된 에너지는 그의 여기 에너지 (광 또는 레이저) 보다 작고, 따라서 파장이 더 길다. 이러한 에너지 또는 파장의 전환 또는 차이에 의해 방출 에너지를 검출하고 여기 에너지로부터 분리할 수 있다.
- [0056] 형광 검출은 일반적으로 여기 광자로부터 방출 광자를 분리하기 위해 여파기 및 방출 광자를 기록하고 대체로 전기 시그날 또는 사진 화상으로서 기록가능한 출력을 생성시키는 검출기를 이용한다. 일반적으로, 4 종류의 승인된 검출기, 즉 형광분광광도기 및 마이크로플레이트 판독기, 형광 현미경, 형광 스캐너 및 유동 세포 측정기가 존재한다. 본 발명에 사용하기 적합한 한 형광 검출기는 미국 뉴저지주 에디슨 소재의 스펙스 인더스트리즈, 인크. (SPEX Industries, Inc.)에서 시판하는 FluoroLog III Spectrofluorometer이다.
- [0057] 요구되지는 않지만, 특히 요구되는 검출 및 교정 프로브쌍의 선택 기준은 (1) 방출 강도를 별개로 측정할 수 있도록 흡수 스펙트럼 또는 형광 스펙트럼이 거의 또는 전혀 중첩되지 않을 것, (2) 독립적으로 방출하도록 근접하게 존재할 때 검출 프로브와 교정 프로브 사이에 유의한 형광 에너지 전달이 발생하지 않을 것 및 (3) 생물학적 유체의 자가형광이 형광 측정에 대한 최소 효과를 갖도록 비교적 긴 방출 파장 (예를 들어, 약 600 nm 초과)을 가질 것을 포함한다. 예를 들어, 도 7은 독립적으로 여기될 수 있도록 거의 중첩되지 않는 여기 스펙트럼을 갖는 교정 프로브 및 검출 프로브의 예를 도시한 것이다.
- [0058] 또한, 필요한 경우 "시분해 형광 검출"로 알려진 기술을 본 발명에 이용할 수도 있다. 시분해 형광 검출은 특정 형광 물질, 예를 들어 유로퓸 (Eu(III)) 및 테르븀 (Tb(III))의 란타나이드 킬레이트의 형광 특성을 이용함으로써 방출원으로부터 또는 산란 과정 (여기 방사선의 산란에 의해)으로부터 배경 시그날을 저하시키도록 디자인된 것이다. 상기 킬레이트는 실질적으로 보다 짧은 파장에서 킬레이트의 여기 후에 강력하게 적색 이동된, 좁은 밴드의 오래 지속되는 방출을 보일 수 있다. 대체로, 킬레이트는 분자 내의 란타나이드에 근접하여 위치한 발색단에 의해 강력한 자외선 흡수 밴드를 보유한다. 발색단에 의한 광 흡수 후에, 여기 에너지는 여기된 발색단으로부터 란타나이드로 전달될 수 있다. 이것은 란타나이드의 형광 방출 특성에 따른다. 좁은 밴드의 방출 필터와 펄스형 (pulsed) 여기 및 시간 게이팅된 (time-gated) 검출을 조합하여 사용하면 란타나이드 킬레이트로부터의 형광만을 특이적으로 검출할 수 있고, 대체로 짧게 지속되거나 보다 짧은 파장 방출을 보이는 샘플에 존재하는 다른 물질종으로부터의 방출을 차단할 수 있다. 형광을 측정하기 위한 다른 시분해 기술은 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제5,585,279호 (데이비드슨 (Davidson)) 및 제5,637,509호 (헤밀라 (Hemmila) 등)에 기재되어 있다.
- [0059] 형광을 측정하기 위해 사용되는 기술에 상관없이, 분석물의 절대량은 포획된 형광 비자기 입자 (41)의 형광 시그날을 포획된 형광 자기 입자 (43)과 비교함으로써 확인할 수 있다. 포획된 형광 비자기 입자 (41)의 형광 강도 (I_s)는 포획된 형광 자기 입자 (43)의 형광 강도 (I_c)와 비교할 수 있다. 포획된 형광 자기 입자 (43)의 총량은 미리 결정되고, 공지되어 있기 때문에 교정 목적을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시태양에서 분석물의 양은 I_s 대 I_c 의 비율에 정비례한다. 검출 대역 (31)이 해당하는 강도 범위를 기초로 하여 분석물의 일반적인 농도 범위를 결정할 수 있다. 그 결과, 교정 및 샘플 시험을 거의 동일한 조건 하에서 동시에 수행할 수 있기 때문에 감도를 증가시키면서 신뢰할 수 있는 정량적 또는 반정량적 결과를 제공할 수 있다.
- [0060] 필요한 경우, I_s 대 I_c 의 비율은 교정 곡선을 만들기 위해 공지의 분석물 농도 범위에 있어서 분석물 농도에 대해 플로팅할 수 있다. 미지의 시험 샘플 내의 분석물의 양을 결정하기 위해서, 이어서 시그날 비율을 교정 곡선에 따라 분석물 농도로 전환시킬 수 있다. 복합체화 및 비복합체화 형광 자기 입자의 포획 효율은 일반적으로

로 임의의 제시된 샘플과 동일함을 알아야 한다. 따라서, 포획 효율의 변화는 형광 강도의 비율 (즉 I_s/I_c)이 절대 형광 대신에 사용되기 때문에 샘플 대 샘플로부터의 결과를 크게 방해하는 것으로 생각되지 않는다. 또한, I_s 과 I_c 사이의 다른 수학적 관계도 교정 곡선을 만들기 위해 분석물 농도에 대해 플로팅할 수 있음을 알아야 한다. 예를 들어, 한 실시태양에서, $I_s/(I_s + I_c)$ 의 값을 분석물 농도에 대해 플로팅하여 교정 곡선을 만들 수 있다.

[0061] 상이한 다른 실시태양도 본 발명에서 생각될 수 있다. 예를 들어, 도 3에서 샌드위치 분석의 다른 포맷을 형성하기 위해 상기하고 도 1에 도시된 장치 (20)을 변형할 수 있다. 한 실시태양에서, 예를 들어 분석물을 포함하는 시험 샘플을 초기에 (1) 제1 결합 성분 (190a)에 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (141a), (2) 형광 자기 입자 (143) 및 (3) 제2 결합 성분 (190b)에 컨쥬게이션된 비형광 자기 입자 (141b)와 혼합할 수 있다. 상기 특정 실시태양에서, 형광 자기 입자 (143)은 분석물에 대한 비특이적 결합을 방지하여 상기 입자 (143)이 단지 교정 프로브로서만 작용하도록 차단제, 예를 들어 β -카제인으로 차단될 수 있다. 또한, 제1 특이적 결합 성분 (190a) 및 제2 특이적 결합 성분 (190b)는 분석물의 유사체일 수 있다.

[0062] 용어 "차단제"는 비분석물질이 표면에 결합하는 것을 "차단" 또는 방지하기 위해서 프로브 표면에 부착하는 시약을 의미한다. 차단제는 β -카제인, 알부민, 예를 들어 소 혈청 알부민, 플루로닉 (pluronic) 또는 다른 계면활성제, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 알콜, 또는 상기 화합물의 황 유도체, 및 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 다른 차단 물질을 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다.

[0063] 다시 도 3에서, 분석물은 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (141a) 및 컨쥬게이션된 비형광 자기 입자 (141b)와 샌드위치 복합체 (149)를 형성한다. 컨쥬게이트 패드 (22)는 다공성 막 (23)과 유체 소통하기 때문에, 복합체 (149)는 컨쥬게이트 패드 (22)로부터 다공성 막 (23) 상에 존재하는 검출 대역 (31)로 이동할 수 있다. 검출 대역 (31)에서, 복합체 (149) 및 임의의 비결합된 입자 (143) 및(또는) (141b)는 이어서 자기 장치 (60)에 의해 포획되어 샘플의 나머지에서 분리된다. 상기한 바와 같이, 분석물의 절대량은 포획된 형광 비자기 입자 (141a)의 형광 강도 (I_s)를 포획된 형광 자기 입자 (143)의 형광 강도 (I_c)와 비교함으로써 확인할 수 있다. 특히, 포획된 형광 자기 입자 (143)의 총량은 미리 결정되고, 공지되어 있기 때문에 교정 목적을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 실시태양에서 분석물의 양은 I_s 대 I_c 의 비율에 정비례한다.

[0064] 또한, 도 4에서, 상기 설명하고 도 1에 도시된 장치 (20)을 경쟁 분석을 형성하기 위해 변형할 수 있다. 한 실시태양에서, 예를 들어 분석물을 포함하는 시험 샘플을 초기에 (1) 제1 결합 성분 (290a)에 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (241) 및 (2) 제2 결합 성분 (290b)에 컨쥬게이션된 형광 자기 입자 (243)과 혼합할 수 있다. 상기 특정 실시태양에서, 제1 결합 성분 (290a)는 분석물과 동일할 수 있지만, 제2 결합 성분 (290b)는 분석물의 유사체일 수 있다.

[0065] 혼합시에, 분석물은 분석물과 형광 자기 입자 (243)의 복합체 (249a) 및 형광 자기 입자 (243)과 형광 비자기 입자 (241)의 복합체 (249b)가 형성되도록 컨쥬게이션된 형광 자기 입자 (243)에 대해 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (241)과 경쟁한다. 컨쥬게이트 패드 (22)는 다공성 막 (23)과 유체 소통하기 때문에, 복합체 (249a) 및 (249b)는 컨쥬게이트 패드 (22)로부터 다공성 막 (23) 상에 존재하는 검출 대역 (31)로 이동할 수 있다. 검출 대역 (31)에서, 복합체 (249a) 및 (249b) 및 임의의 비결합된 입자 (243)은 이어서 자기 장치 (60)에 의해 포획되고 샘플의 나머지에서 분리된다. 상기한 바와 같이, 분석물의 절대량은 포획된 형광 비자기 입자 (241)의 형광 강도 (I_s)를 포획된 복합체화 또는 비복합체화 형광 자기 입자 (243)의 형광 강도 (I_c)와 비교함으로써 확인할 수 있다. 특히, 포획된 형광 자기 입자 (243)의 총량은 미리 결정되고, 공지되어 있기 때문에 교정 목적을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 상기 실시태양에서 분석물의 양은 I_s 대 I_c 의 비율에 반비례한다.

[0066] 도 5에서, 상기 설명하고 도 1에 도시된 장치 (20)을 다른 경쟁 분석을 형성하기 위해 변형할 수 있다. 한 실시태양에서, 예를 들어 분석물을 포함하는 시험 샘플을 초기에 (1) 제1 결합 성분 (390a)에 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (341a), (2) 형광 자기 입자 (343) 및 (3) 제2 결합 성분 (390b)에 컨쥬게이션된 비형광 자기 입자 (341b)와 혼합할 수 있다. 상기 특정 실시태양에서, 제1 결합 성분 (390a)는 분석물과 동일할 수 있지만, 제2 결합 성분 (390b)는 분석물의 유사체일 수 있다. 또한, 형광 자기 입자 (343)은 분석물에 대한 비특이적 결합을 방지하여 상기 입자가 단지 교정 프로브로서만 작용하도록 차단제, 예를 들어 β -카제인으로 차단될 수 있다.

[0067] 혼합시에, 분석물은 분석물과 비형광 자기 입자 (341b)의 복합체 (349a) 및 비형광 자기 입자 (341b)와 형광 비

자기 입자 (341a)의 복합체 (349b)가 형성되도록 컨쥬게이션된 비형광 자기 입자 (341b)에 대해 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (341)과 경쟁한다. 컨쥬게이트 패드 (22)는 다공성 막 (23)과 유체 소통하기 때문에, 복합체 (349a) 및 (349b)는 컨쥬게이트 패드 (22)로부터 다공성 막 (23) 상에 존재하는 검출 대역 (31)로 이동할 수 있다. 검출 대역 (31)에서, 복합체 (349a) 및 (349b) 및 임의의 비결합된 입자 (343) 및(또는) (341b)는 이어서 자기 장치 (60)에 의해 포획되고, 샘플의 나머지로 부터 분리된다. 상기한 바와 같이, 분석물의 절대량은 포획된 형광 비자기 입자 (341a)의 형광 강도 (I_s)를 포획된 형광 자기 입자 (343)의 형광 강도 (I_c)와 비교함으로써 확인할 수 있다. 특히, 포획된 형광 자기 입자 (343)의 총량은 미리 결정되고 공지되어 있기 때문에, 교정 목적을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 상기 실시태양에서 분석물의 양은 I_s 대 I_c 의 비율에 반비례한다.

[0068] 분석 시스템 형태의 상이한 실시태양을 상기 설명하였지만, 본 발명의 분석 시스템은 일반적으로 임의의 요구되는 형태를 가질 수 있음을 이해하여야 한다. 예를 들어, 경쟁 분석은 입자 (241)이 형광 자기 입자이고 입자 (243)이 형광 비자기 입자인 것을 제외하고 도 4에 도시되고 상기 설명한 바와 같이 형성할 수 있다. 유사하게, 경쟁 분석은 입자 (341a)가 비형광 자기 입자이고, 입자 (341b)가 형광 비자기 입자인 것을 제외하고, 도 5에 도시되고 상기 설명한 바와 같이 형성할 수 있다. 또한, 유동 막 기반 분석 장치 이외에 다른 종류의 분석 장치, 예를 들어 모세관, 유체 기반 및 용액 기반 분석도 본 발명에 사용할 수 있다. 상이한 다른 분석 형태는 또한 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제4,596,695호 (코팅햄 (Cottingham)), 제 5,145,784호 (콕스 (Cox) 등), 제5,395,754호 (람보트 (Lambotte) 등), 제5,670,381호 (조우 (Jou) 등) 및 제 6,194,220호 (말릭 (Malick) 등)에 기재되어 있다.

[0069] 또한, 교정 및 검출을 위한 메카니즘으로서 구체적으로 형광을 이용하는 것에 관련된 상이한 실시태양을 위에서 설명하였지만, 다른 공지된 검출 메카니즘을 본 발명에 동등하게 적용할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 검출 및(또는) 교정 프로브는 화학발광 또는 인광 화합물일 수 있다. 예를 들어, 화학발광 프로브는 당업계에 공지된 적합한 반응물을 사용하여 여기시킬 수 있다. 또다른 실시태양 및 형태도 본 발명에서 고려된다.

[0070] 따라서, 본 발명자들은 자기 입자 처리를 이용하여 분석물의 분리 및 검출을 확립할 수 있음을 밝혀내었다. 구체적으로, 자기 분리 및 검출 기술 (예를 들어, 형광)이 통합 시스템에 설치된다. 또한, 시스템은 통상적인 외부 교정 기술을 사용할 때 대조 교정 샘플의 필요성을 배제하기 위해 자가교정된다. 한 실시태양에서, 자가교정은 형광 자기 프로브를 사용하여 달성된다. 형광 자기 프로브 및 형광 비자기 프로브로부터 방출된 형광은 동일한 샘플 상에서 별개로 측정할 수 있다. 자기 입자의 수가 미리 결정되기 때문에, 시스템은 포획된 형광 비자기 프로브의 양 및 이어서 분석물의 양을 측정할 때 자가교정된다. 또한, 교정 및 검출 프로브의 형광이 동일한 조건 하에서 동시에 측정되기 때문에, 많은 변수, 예를 들어 온도 및 도구 불안정성에 의한 잠재적인 방해물을 방지하여 검출 신뢰도 및 일관성을 개선시킬 수 있다.

[0071] 본 발명은 이하의 실시예를 참고로 하여 보다 잘 이해할 수 있다.

[0072] **실시예 1**

[0073] 예를 들어, 도 3에 도시된 샌드위치 분석을 사용하여 분석물의 존재를 검출하는 본 발명의 능력을 증명하였다. 초기에, 다음 성분들을 6개의 에펜도르프 (Eppendorf) 바이알에 첨가하였다:

- [0074] (1) 25 마이크로리터의 공유결합에 의해 컨쥬게이션된 비형광 자기 입자 (PBS 완충액 중의 3 mg/ml),
- [0075] (2) 15 마이크로리터의 공유결합에 의해 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (PBS 완충액 중의 2 mg/ml),
- [0076] (3) 10 마이크로리터의 카제인에 의해 차단된 형광 자기 입자 (PBS 완충액 중의 3 mg/ml), 및
- [0077] (4) 0, 10 마이크로리터 (1 마이크로그램/ml), 20 마이크로리터 (1 마이크로그램/ml), 40 마이크로리터 (1 마이크로그램/ml), 40 마이크로리터 (2 마이크로그램/ml) 및 80 마이크로리터 (2 마이크로그램/ml) 범위의 혈청황색 소화 호르몬 (LH) 분석물.

[0078] 각각의 에펜도르프 바이알에, 150 마이크로리터의 최종 부피가 되도록 적절한 양의 PBS 완충액을 첨가하였다. 샘플을 부드럽게 진탕하면서 실온에서 10분 동안 인큐베이팅하였다. 이어서 자기 입자를 자기 분리기 (다이날, 인크.)로 분리하였다. 각 바이알로부터의 상등액을 폐기하고 자기 입자를 1.5 ml의 PBS에 재현탁시켰다. 300 마이크로리터의 형광 자기 입자 현탁액을 각 형광 측정에 사용하였다. 미국 뉴저지주 에디슨 소재의 스펙스 인더스트리즈로부터 입수한 "Fluorolog III Spectrofluorometer"를 사용하여 직각 방식 (right angle mode)을 이용하여 샘플의 형광을 측정하였다. 470 나노미터의 여기 파장 및 560 나노미터의 방출 파장을 형광 자기 입자에 대해 사용하고, 570 나노미터의 여기 파장 및 605 나노미터의 방출 파장을 형광 비자기 입자에 대해 사용하

였다. 통합 (integration) 시간은 0.2초였다.

[0079] 표준화 및 교정 형광 강도를 각 샘플 내의 LH 용량의 함수로서 도 8에 도시한다. 표준화 강도는 샘플의 측정된 형광 강도를 대조 샘플의 형광 강도로 나누어 얻었다. 대조 샘플은 분석물이 없는 샘플이었다.

[0080] 실시예 1에 사용된 입자는 다음과 같이 형성하였다:

[0081] 비형광 자기 입자

[0082] 125 마이크로리터의 10% 카르복실레이트-개질 상자성 입자 (0.35 미크론, Estapor(등록상표) 초상자성 미세구, 방스 래보라토리스, 인크. (Bang's Laboratories, Inc.) 제품)를 자기 분리기를 사용하여 1.5 ml의 탄산염 완충액으로 1회, PBS로 2회 세척하였다. 세척한 입자를 0.6 ml PBS 및 15 mg 카르보다이미드 (폴리사이언시스, 인크. (Polysciences, Inc.) 제품) 중에 재현탁시켰다. 혼합물을 진탕기 상에서 실온 (RT)에서 30분 동안 반응시켰다. 이어서, 활성화된 입자를 보레이트 완충액으로 2회 세척하였다. 활성화된 입자를 1.2 ml의 보레이트 완충액에 다시 재현탁시켰다. 이어서, 30 마이크로리터의 LH β-모노클로날 항체 (9.8 mg/ml, 피쯔제랄드 인터내셔널, 인크. (Fitzgerald Industries International, Inc.) 제품)를 활성화된 입자에 첨가하였다. 반응 혼합물을 진탕기 상에서 실온에서 밤새 반응시켰다. 이어서 활성화된 입자를 수집하고 15분 동안 부드럽게 진탕하면서 1 ml의 0.1M 에탄올아민 중에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 입자를 PBS로 2회 세척하고 4°C에서 0.1M PBS, 0.15M NaCl, 1% β-카제인, 5% 글리세롤 및 0.1% NaN₃을 함유한 완충액 중에 보관하였다.

[0083] 형광 비자기 입자

[0084] 결합 성분이 LH β-모노클로날 항체 대신 LH α-모노클로날 항체 (9.8 mg/ml, 피쯔제랄드 인터내셔널, 인크. 제품)인 것을 제외하고는, "형광 비자기" 입자를 상기한 절차에 따라 공유결합에 의해 컨쥬게이션시켰다. 사용된 입자는 FluoSpheres(등록상표) 카르복실레이트-개질 미세구 (몰레큘라 프로브스, 인크. 제품)이었다. 입자의 크기는 0.5 미크론이고, 580 나노미터의 여기 파장 및 605 나노미터의 방출 파장에서 적색 형광이었다.

[0085] 형광 자기 입자

[0086] 100 마이크로리터의 형광 초상자성 입자 (미국 펜실베이니아주 워링턴 소재의 폴리사이언시스, 인크.로부터 입수함)의 2.76% 고흡물 현탁액을 에펜도르프관 중에서 1 ml의 보레이트 완충액 (0.1M, pH = 8.5)과 합하였다. 상기 입자는 평균 직경이 1 내지 2 미크론이고, 단백질과의 수동 흡착 및 관능기 반응을 위한 폴리스티렌 표면을 갖는 철-함유 미세구인 것으로 생각된다. 입자를 다이날 인크.로부터 입수한 자기 분리기로 분리하고 0.1M 보레이트 완충액 중의 200 마이크로리터의 10 mg/ml β-카제인 용액에 재현탁시켰다. 현탁액을 부드럽게 혼합하면서 30분 동안 인큐베이팅하였다. 상기 단계를 2회 반복하였다. 분리된 입자를 200 마이크로리터의 PBS에 재현탁시키고 4°C에 보관하였다.

[0087] 혈청황색소화 호르몬 (LH)

[0088] "혈청황색소화 호르몬 (LH)"을 피쯔제랄드 인터내셔널, 인크.로부터 입수하였다.

[0089] **실시예 2**

[0090] 예를 들어, 도 1에 도시된 샌드위치 분석을 사용하여 분석물의 존재를 검출하는 본 발명의 능력을 증명하였다. 초기에, 다음 성분들을 6개의 에펜도르프 바이알에 첨가하였다:

[0091] (1) 5 마이크로리터의 공유결합에 의해 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (PBS 완충액 중의 2 mg/ml),

[0092] (2) 15 마이크로리터의 물리적 흡수 컨쥬게이션된 형광 자기 입자 (PBS 완충액 중의 3 mg/ml), 및

[0093] (3) 0, 5, 10 마이크로리터, 20, 40, 및 100 마이크로리터 (2 마이크로그램/ml) 범위의 혈청황색소화 호르몬 (LH) 분석물.

[0094] 각각의 에펜도르프 바이알에, 150 마이크로리터의 최종 부피가 되도록 적절한 양의 PBS 완충액을 첨가하였다. 샘플을 부드럽게 진탕하면서 실온에서 25분 동안 인큐베이팅하였다. 이어서 자기 입자를 자기 분리기 (다이날, 인크.)로 분리하였다. 각 바이알로부터의 상등액을 폐기하고 자기 입자를 1.5 ml의 PBS에 재현탁시켰다. 300 마이크로리터의 형광 자기 입자 현탁액을 각 형광 측정에 사용하였다. 스펙스 인터스트리즈, 인크.로부터 입수한 "Fluorolog III Spectrofluorometer"를 사용하여 직각 방식을 이용하여 샘플의 형광을 측정하였다. 470 나노미터의 여기 파장 및 560 나노미터의 방출 파장을 형광 자기 입자에 대해 사용하고, 570 나노미터의 여기 파

장 및 605 나노미터의 방출 파장을 형광 비자기 입자에 대해 사용하였다. 통합 시간은 0.2 내지 1초였다.

[0095] 표준화 및 교정 형광 강도를 각 샘플 내의 LH 용량의 함수로서 도 9에 도시한다.

[0096] 실시예 2에 사용된 입자는 다음과 같이 형성하였다:

[0097] 형광 비자기 입자

[0098] "형광 비자기" 입자는 실시예 1에서 설명한 바와 같이 형성하였다.

[0099] 형광 자기 입자

[0100] 2.76 mg의 형광 초상자성 입자 (수성 현탁액 중 2.5% 고형물)를 폴리사이언시스, 인크.로부터 입수하였다. 입자를 보레이트 완충액으로 3회 세척하고 다이날 인크.로부터 입수한 자기 분리기로 분리시켰다. 세척한 입자를 200-마이크로리터 보레이트 완충액에 재현탁하고, 82 마이크로그램의 β-혈청황색소화 호르몬 (β-LH) 모노클로날 항체 (1 mg/ml, 피쯔제랄드 인터스터리즈 인터내셔널, 인크. 제품)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 부드럽게 혼합하였다. 이어서, 입자를 자기 분리기로 수집하고 비특이적 결합 부위를 차단시키기 위해 부드럽게 혼합하면서 30분 동안 200 마이크로리터의 β-카제인 (보레이트 완충액 중의 10 mg/ml)과 함께 인큐베이팅하였다. 차단된 입자를 PBS로 2회 세척하고 0.1M PBS 중에 보관하였다.

[0101] 혈청황색소화 호르몬 (LH)

[0102] "혈청황색소화 호르몬 (LH)"을 피쯔제랄드 인터스터리즈 인터내셔널, 인크.로부터 입수하였다.

[0103] 실시예 3

[0104] 자가-교정된 자기 결합 분석을 비교정된 자기 결합 분석과 비교하였다.

[0105] 자가-교정 없음

[0106] 초기에, 다음 성분들을 5 에펜도르프 바이알 (표 1에서 바이알 번호 2-6)에 첨가하였다:

- [0107] (1) 15 마이크로리터의 공유결합에 의해 컨쥬게이션된 비형광 자기 입자 (0.1M PBS 완충액 중의 3 mg/ml),
- [0108] (2) 15 마이크로리터의 공유결합에 의해 컨쥬게이션된 형광 비자기 입자 (PBS 완충액 중의 2 mg/ml),
- [0109] (3) 20 마이크로리터의 혈청황색소화 호르몬 (LH) 분석물 (1 마이크로그램/ml), 및
- [0110] (4) 20 마이크로리터의 PBS.

[0111] 또한, 비교 에펜도르프 바이알은 20 마이크로리터의 PBS만을 사용하여 형성하였다 (표 1에서 바이알 번호 1).

[0112] 샘플을 부드럽게 진탕하면서 실온에서 20분 동안 인큐베이팅하였다. 이어서 자기 입자를 다이날, 인크.로부터 입수한 자기 분리기로 분리시켰다. 각 바이알로부터의 상등액을 폐기하고 자기 입자를 1.5 ml의 PBS에 재현탁시켰다. 300 마이크로리터의 형광 자기 입자 현탁액을 각 형광 측정에 사용하였다. 스펙스 인터스트리즈, 인크.으로부터 입수한 "Flouorolog III Spectrofluorometer"를 사용하여 직각 방식을 이용하여 샘플의 형광을 측정하였다. 570 나노미터의 여기 파장 및 605 나노미터의 방출 파장을 상이한 일자의 형광 측정을 위해 사용하였다.

[0113] 표 1은 각 일자에 대한 상대적 형광 데이터를 나타낸 것이다.

표 1

[0114] 형광 측정

바이알	번호 1	번호 2	번호 3	번호 4	번호 5	번호 6	표준편차%
제1일	13	254	215	263	285	291	11
제2일	12	235	207	300	263	299	15
제3일	12	183	176	213	270	266	20
제4일	18	265	226	275	282	293	10
제5일	9	207	193	246	236	244	10
제6일	14	227	202	252	262	274	12
표준편차%	23	13	8	11	6	7	

[0115] 자가-교정 있음

[0116] 초기에, 다음 성분들을 5개의 에펜도르프 바이알에 첨가하였다 (표 2에서 바이알 번호 9-13):

[0117] (1) 15 마이크로리터의 공유결합에 의해 컨주게이션된 비형광 자기 입자 (0.1M PBS 완충액 중의 3 mg/ml),

[0118] (2) 15 마이크로리터의 공유결합에 의해 컨주게이션된 형광 비자기 입자 (PBS 완충액 중의 2 mg/ml),

[0119] (3) β-카제인으로 차단된 20 마이크로리터의 형광 자기 입자 (PBS 완충액 중의 3 mg/ml),

[0120] (4) 20 마이크로리터의 혈청황색소화 호르몬 (LH) 분석물 (1 마이크로그램/ml), 및

[0121] (5) 20 마이크로리터의 PBS.

[0122] 또한, 비교 에펜도르프 바이알은 20 마이크로리터의 PBS만을 사용하여 형성하였다 (표 2에서 바이알 번호 8).

[0123] 샘플을 부드럽게 진탕하면서 실온에서 20분 동안 인큐베이팅하였다. 이어서 자기 입자를 다이날, 인크.로부터 입수한 자기 분리기로 분리시켰다. 각 바이알로부터의 상등액을 폐기하고 자기 입자를 1.5 ml의 PBS에 재현탁 시켰다. 300 마이크로리터의 형광 자기 입자 현탁액을 각 형광 측정에 사용하였다. "Flouorolog III Spectrofluorometer"를 사용하여 직각 방식을 이용하여 샘플의 형광을 측정하였다. 470 나노미터의 여기 파장 및 560 나노미터의 방출 파장을 형광 자기 입자에 대해 사용하고, 570 나노미터의 여기 파장 및 605 나노미터의 방출 파장을 형광 비자기 입자에 대해 사용하였다. 표 2는 각 입자에 대한 상대적 형광 데이터를 나타낸 것이다.

표 2

[0124] 형광 측정

바이알	번호 8	번호 9	번호 10	번호 11	번호 12	번호 13	표준편차%
제1일	31/32	352/47	344/43	300/41	318/44	369/39	12
제2일	31/42	324/42	329/41	323/46	338/47	418/43	14
제3일	28/39	307/40	333/42	282/42	288/40	425/46	12
제4일	30/41	267/36	292/36	271/41	281/38	356/43	8.8
제5일	21/29	252/33	292/34	258/38	275/36	328/37	10
제6일	21/25	237/33	307/38	265/40	288/35	358/39	12
표준편차%	13	3	3	4	5	6	

[0125] 2개의 시스템에 대한 각 세트의 샘플의 비교로부터 알 수 있는 바와 같이, 자가-교정된 시스템에 대한 표준 편차 (표준 편차 %)는 주의깊게 제어된 조건 하에서조차 자가-교정이 없는 표준 편차보다 유의하게 더 작았다. 자가-교정된 시스템은 측정 조건에 보다 덜 의존적이므로, 자가-교정된 시스템에 대한 표준 편차는 조건이 주의 깊게 제어되지 않을 때 자가-교정이 없는 표준 편차보다 훨씬 더 작을 것으로 예상된다.

[0126] 실시예 3에 사용된 입자는 다음과 같이 형성하였다:

[0127] 비형광 자기 입자

[0128] "비형광 자기" 입자는 실시예 1에서 설명한 바와 같이 형성하였다.

[0129] 형광 비자기 입자

[0130] "형광 비자기" 입자는 실시예 1에서 설명한 바와 같이 형성하였다.

[0131] 형광 자기 입자

[0132] "형광 자기 입자"는 실시예 2에서 설명한 바와 같이 형성하였다.

[0133] 혈청황색소화 호르몬 (LH)

[0134] "혈청황색소화 호르몬 (LH)"을 피쯔제랄드 인더스트리즈 인터내셔널, 인크.로부터 입수하였다.

[0135] 실시예 4

[0136] 예를 들어, 도 3에 도시된 샌드위치 분석을 사용하여 분석물의 존재를 검출하는 본 발명의 능력을 증명하였다. 초기에, 다음 성분들을 6개의 에펜도르프 바이알에 첨가하였다:

[0137] (1) 30 마이크로리터의 공유결합에 의해 컨주게이션된 비형광 자기 입자 (PBS 완충액 중의 2 mg/ml),

[0138] (2) 20 마이크로리터의 공유결합에 의해 컨주게이션된 형광 비자기 입자 (PBS 완충액 중의 2 mg/ml),

[0139] (3) β -카제인에 의해 차단된 15 마이크로리터의 형광 자기 입자 (PBS 완충액 중의 1 mg/ml), 및

[0140] (4) 0, 5, 10, 20, 50 및 100 마이크로리터 범위의 C-반응성 단백질 (CRP) 분석물 (PBS 중 0.2 마이크로그램/ml).

[0141] 샘플을 부드럽게 진탕하면서 실온에서 20분 동안 인큐베이팅하였다. 이어서 자기 입자를 다이날, 인크.로부터 입수한 자기 분리기로 분리시켰다. 각 바이알로부터의 상등액을 폐기하고 자기 입자를 1.5 ml의 PBS에 재현탁시켰다. 300 마이크로리터의 형광 자기 입자 현탁액을 각 형광 측정에 사용하였다. 스펙스 인더스트리즈, 인크.로부터 입수한 "Flouolog III Spectrofluorometer"를 사용하여 직각 방식을 이용하여 샘플의 형광을 측정하였다. 470 나노미터의 여기 파장 및 560 나노미터의 방출 파장을 형광 자기 입자에 대해 사용하고, 570 나노미터의 여기 파장 및 605 나노미터의 방출 파장을 형광 비자기 입자에 대해 사용하였다. 통합 시간은 0.2 내지 1 초였다. 표준화 형광 강도를 각 샘플 내의 CRP 용량의 함수로서 도 10에 도시하였다.

[0142] 실시예 4에 사용된 입자는 다음과 같이 형성하였다:

[0143] 비형광 자기 입자

[0144] 125 마이크로리터의 10% 카복실레이트-개질 상자성 입자 (0.35 미크론, Estapor(등록상표) 초상자성 미세구, 방스 래보라토리스, 인크. 제품)를 자기 분리기를 사용하여 1.5 ml의 탄산염 완충액으로 1회, 포스페이트 완충액 염수 (PBS)로 2회 세척하였다. 세척한 입자를 0.6 ml PBS 및 15 mg 카르보다이미드 (폴리사이언시스, 인크. 제품) 중에 재현탁시켰다. 혼합물을 진탕기 상에서 실온 (RT)에서 30분 동안 반응시켰다. 이어서, 활성화된 입자를 보레이트 완충액으로 2회 세척하였다. 활성화된 입자를 다시 1.2 ml의 보레이트 완충액에 재현탁시켰다. 이어서, 30 마이크로리터의 항-C-반응성 단백질 (항-CRP1) 모노클로날 항체 (Mab A5804, 2mg/ml, 바이오퍼시픽, 인크. (BiosPacific, Inc.) 제품)를 활성화된 입자에 첨가하였다. 반응 혼합물을 진탕기 상에서 실온에서 밤새 반응시켰다. 이어서 활성화된 입자를 수집하고 15분 동안 부드럽게 진탕하면서 1 ml의 0.1M 에탄올아민 중에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 입자를 PBS로 2회 세척하고 4°C에서 0.1M PBS, 0.15M NaCl, 1% β -카제인, 5% 글리세롤 및 0.1% NaN_3 을 함유한 완충액 중에 보관하였다.

[0145] 형광 비자기 입자

[0146] 결합 성분이 항-CRP1 대신 항-C-반응성 단백질 (항-CRP2) 모노클로날 항체 (2 mg/ml, 바이오퍼시픽, 인크. 제품)인 것을 제외하고는, "형광 비자기" 입자를 상기한 절차에 따라 공유결합에 의해 컨주게이션시켰다. 사용된 입자는 FluoSpheres(등록상표) 카복실레이트-개질 미세구 (몰레큘라 프로브스, 인크. 제품)이었다. 입자의 크기는 0.5 μm 이고, 580 나노미터의 여기 파장 및 605 나노미터의 방출 파장에서 적색 형광이었다.

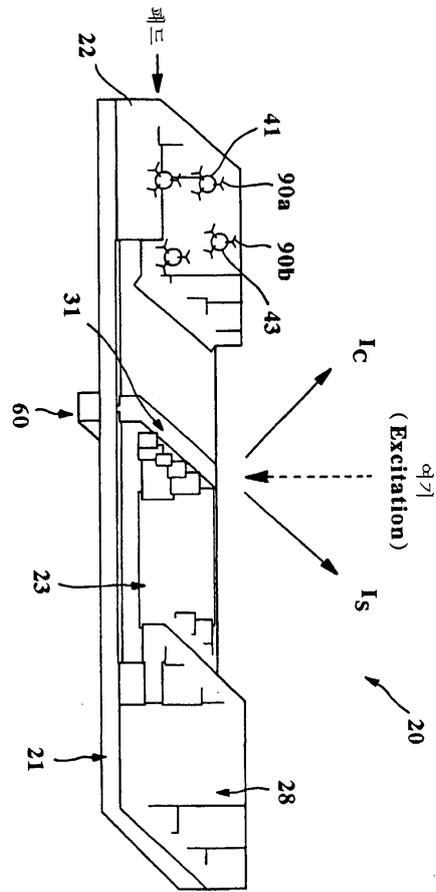
[0147] 형광 자기 입자

[0148] 100 마이크로리터의 형광 초상자성 입자 (미국 펜실베이니아주 워링턴 소재의 폴리사이언시스, 인크.로부터 입수함)의 2.76% 고흡물 현탁액을 에펜도르프관 중에서 1 ml의 보레이트 완충액 (0.1M, pH = 8.5)과 혼합하였다. 상기 입자는 평균 직경이 1 내지 2 미크론이고, 단백질과의 수동 흡착 및 관능기 반응을 위한 폴리스티렌 표면을 갖는 철-함유 미세구인 것으로 생각된다. 이어서, 1 ml의 보레이트 완충액 (0.1M, pH = 8.5)을 에펜도르프관 내의 입자에 첨가하였다. 입자를 다이날, 인크.로부터 입수한 자기 분리기로 분리하고, 입자를 0.1M 보레이트 완충액 중의 β -카제인의 10 mg/ml 용액 200 마이크로리터에 재현탁시켰다. 현탁액을 부드럽게 혼합하면서 30분 동안 인큐베이팅하였다. 상기 단계를 2회 반복하였다. 분리된 입자를 200 마이크로리터의 PBS에 재현탁시키고 4°C에 보관하였다.

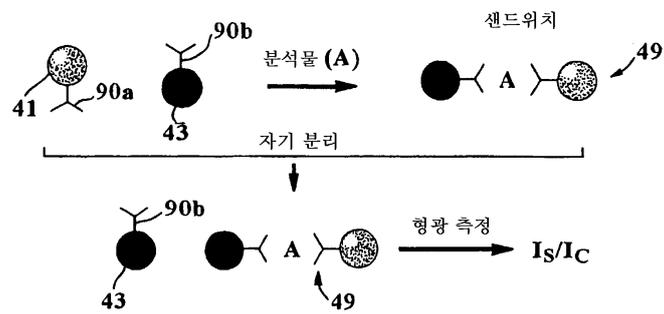
- [0149] C-반응성 단백질(CRP)
- [0150] "C-반응성 단백질 (CRP)"은 바이오퍼시픽, 인크.로부터 입수하였다.
- [0151] 본 발명의 그의 구체적인 실시태양에 관련하여 상세히 설명하였지만, 당업계의 숙련인은 상기한 내용을 이해하면 상기 실시태양의 변경, 변동 및 동등물을 쉽게 생각할 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 본 발명의 범위는 첨부된 청구의 범위와 그에 대한 임의의 동등물의 범위로서 평가되어야 한다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0021] 그의 최량의 실시형태를 포함하여 본 발명의 전체적이고 실시가능한 개시내용은 첨부 도면을 참고로 하여 본원 명세서의 나머지 부분에 보다 상세하게 제시된다.
- [0022] 도 1은 본 발명의 유체역학 기반 장치의 일실시태양의 투시도이다.
- [0023] 도 2는 본 발명의 샌드위치 분석 포맷의 일실시태양에 사용되는 메카니즘을 보여주는 모식도이다.
- [0024] 도 3은 본 발명의 샌드위치 분석 포맷의 다른 실시태양에 사용되는 메카니즘을 보여주는 모식도이다.
- [0025] 도 4는 본 발명의 경쟁 분석 포맷의 일실시태양에 사용되는 메카니즘을 보여주는 모식도이다.
- [0026] 도 5는 본 발명의 경쟁 분석 포맷의 다른 실시태양에 사용되는 메카니즘을 보여주는 모식도이다.
- [0027] 도 6은 항체를 카르복실레이트 나노입자에 공유결합에 의해 컨쥬게이션시키는 일실시태양을 보여주는 모식도이다.
- [0028] 도 7은 본 발명의 일실시태양에 따른 교정 프로브 (C) 및 검출 프로브 (FP)의 여기 (EX) 및 방출 (EM) 스펙트럼을 보여준다.
- [0029] 도 8은 실시예 1에서 설명되는, 표준화된 형광 강도 대 혈청황색소화 호르몬 (LH)의 양을 보여준다.
- [0030] 도 9는 실시예 2에서 설명되는, 표준화된 형광 강도 대 혈청황색소화 호르몬 (LH)의 양을 보여준다.
- [0031] 도 10은 실시예 4에서 설명되는, 표준화된 형광 강도 대 C-반응성 단백질 (CRP)의 양을 보여준다.
- [0032] 본원 명세서와 도면에서 참조 부호의 반복 사용은 본 발명의 동일하거나 유사한 특징부 또는 성분을 나타내기 위한 것이다.

도면

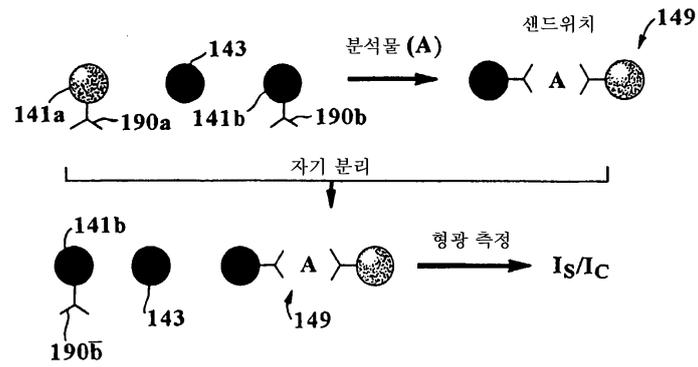
도면1



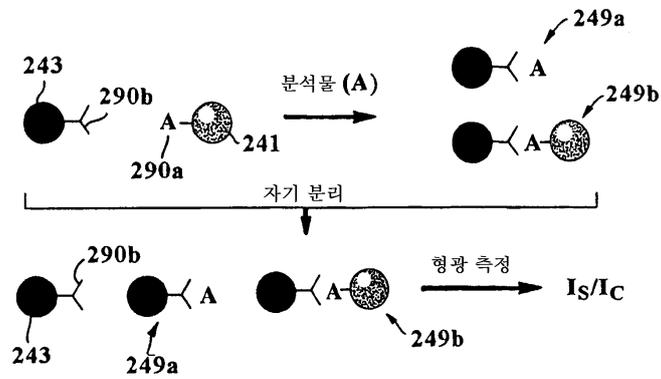
도면2



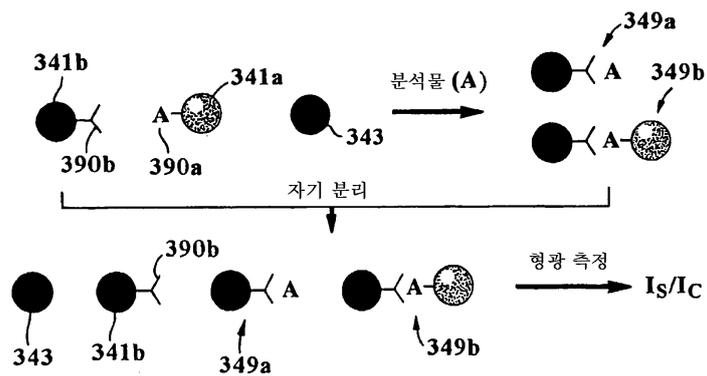
도면3



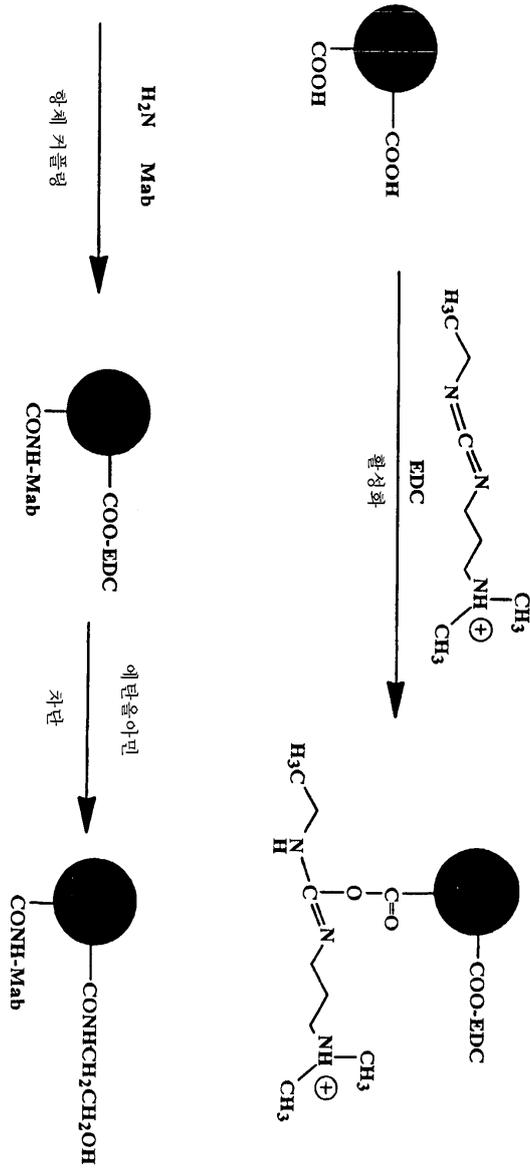
도면4



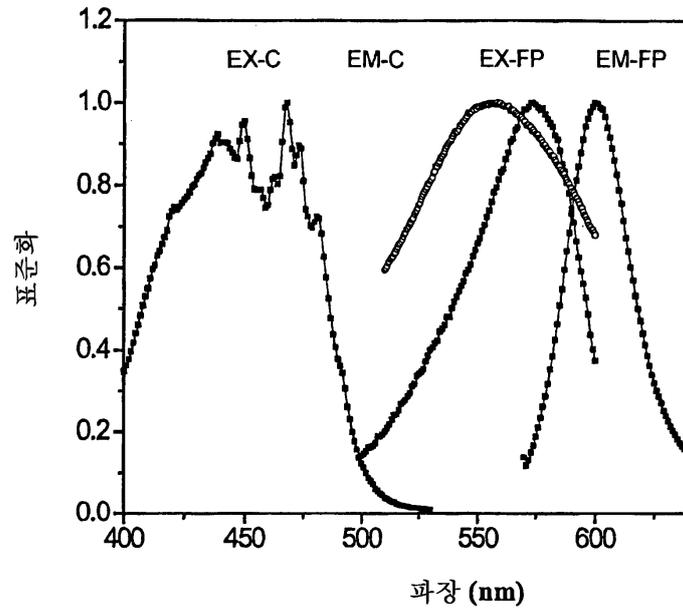
도면5



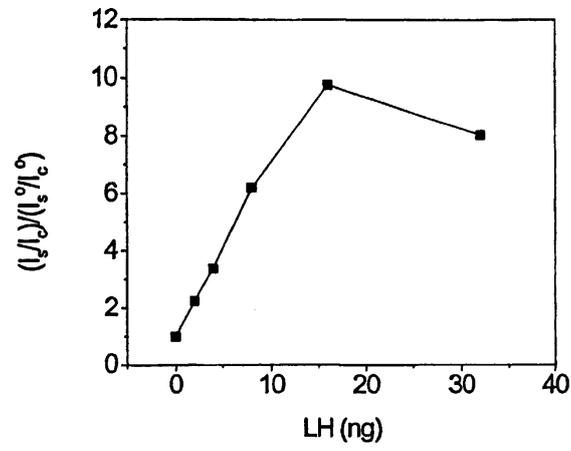
도면6



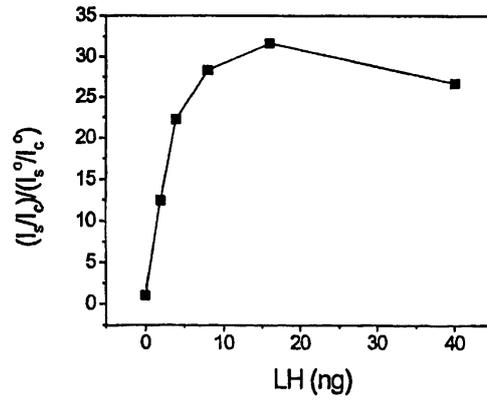
도면7



도면8



도면9



도면10

