

(21)申請案號：100120882

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 15 日

(51)Int. Cl. : **G01N21/65 (2006.01)**  
**B82B1/00 (2006.01)**

**B22F1/00 (2006.01)**  
**B82B3/00 (2006.01)**

(30)優先權：2010/06/15 日本

2010-136137

(71)申請人：日產化學工業股份有限公司 (日本) NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (JP)  
 日本

(72)發明人：古性均 FURUSHO, HITOSHI (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：26 共 69 頁

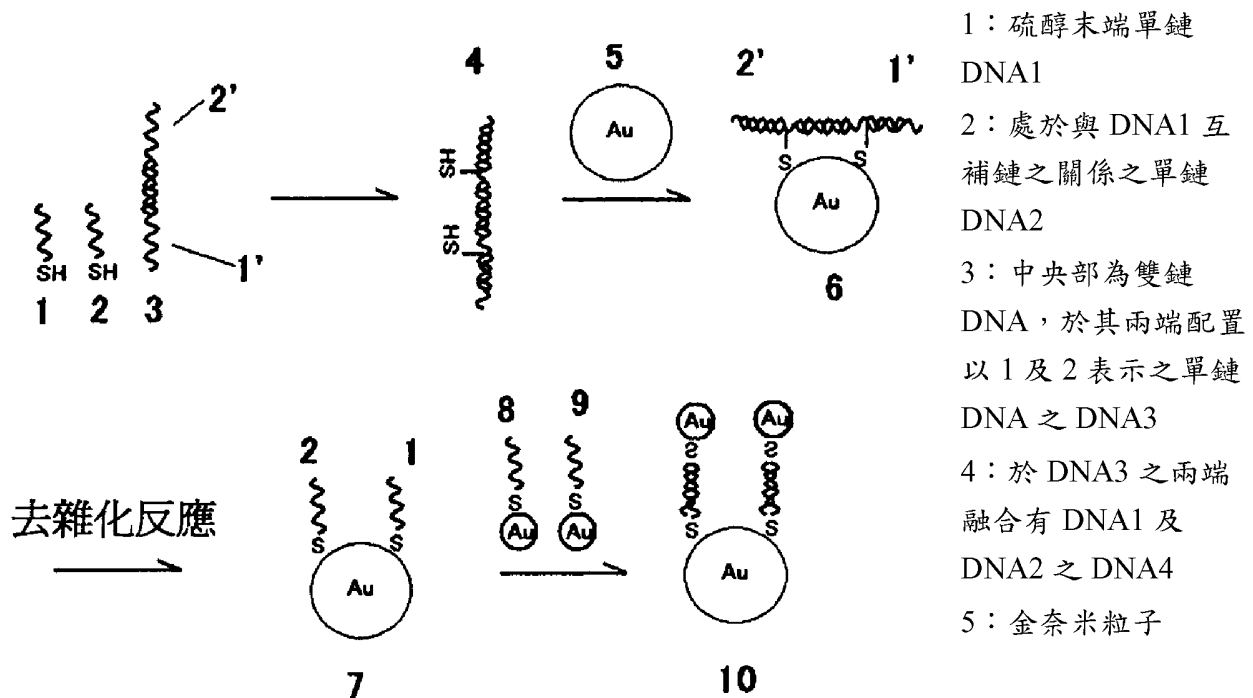
(54)名稱

表面增強拉曼散射用金屬粒子及分子感測

METAL PARTICLE FOR SURFACE ENHANCED RAMAN SCATTERING AND MOLECULAR SENSING

(57)摘要

本發明提供一種增強拉曼散射用金屬奈米粒子，尤其是藉由粒子間距離之控制而控制其增強電場強度，且藉由賦予非常強的拉曼散射特性而提供高感度拉曼散射感測。本發明提供一種分子感測用金屬奈米粒子材料，其係具備金屬奈米粒子集合體，該金屬奈米集合體係透過有機分子而連結金屬奈米粒子，藉以使 3 至 10 個金屬奈米粒子以各相鄰金屬奈米粒子間以特定距離結合而成者，且該集合體係於對其施加之電場內包含拉曼活性分子，而於增強電場中發出來自拉曼分子之經增強的拉曼散射光者；本發明亦提供該分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法及使用該分子感測用金屬奈米粒子材料之分子感測。



6：於表面介隔硫醇基  
結合有 DNA4 之金奈  
米粒子

7：利用加溫使雙鏈解  
離並分離後之金奈米  
粒子

8：吸附有單鏈 DNA1  
之金奈米粒子

9：吸附有互補鏈  
DNA2 之金奈米粒子

10：金奈米粒子集合  
體

(21)申請案號：100120882

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 15 日

(51)Int. Cl. : **G01N21/65 (2006.01)**  
**B82B1/00 (2006.01)**

**B22F1/00 (2006.01)**  
**B82B3/00 (2006.01)**

(30)優先權：2010/06/15 日本

2010-136137

(71)申請人：日產化學工業股份有限公司 (日本) NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (JP)  
 日本

(72)發明人：古性均 FURUSHO, HITOSHI (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：26 共 69 頁

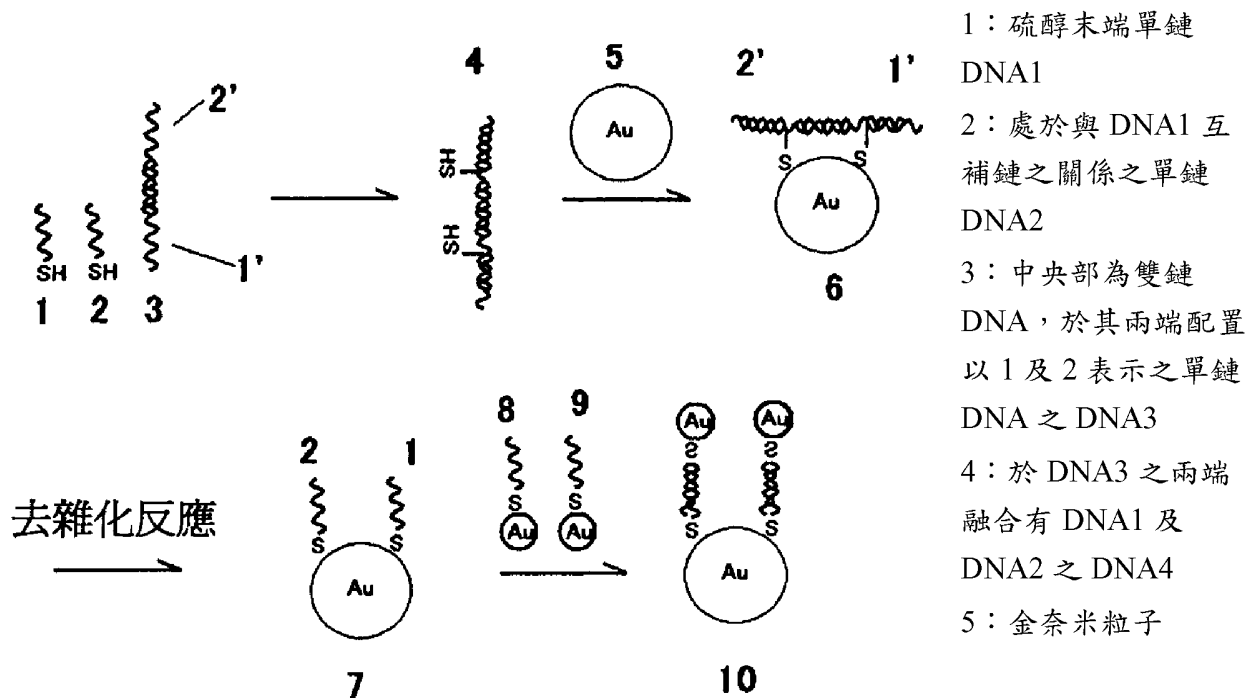
(54)名稱

表面增強拉曼散射用金屬粒子及分子感測

METAL PARTICLE FOR SURFACE ENHANCED RAMAN SCATTERING AND MOLECULAR SENSING

(57)摘要

本發明提供一種增強拉曼散射用金屬奈米粒子，尤其是藉由粒子間距離之控制而控制其增強電場強度，且藉由賦予非常強的拉曼散射特性而提供高感度拉曼散射感測。本發明提供一種分子感測用金屬奈米粒子材料，其係具備金屬奈米粒子集合體，該金屬奈米集合體係透過有機分子而連結金屬奈米粒子，藉以使 3 至 10 個金屬奈米粒子以各相鄰金屬奈米粒子間以特定距離結合而成者，且該集合體係於對其施加之電場內包含拉曼活性分子，而於增強電場中發出來自拉曼分子之經增強的拉曼散射光者；本發明亦提供該分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法及使用該分子感測用金屬奈米粒子材料之分子感測。



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係有關應用表面電漿子 ( plasmon ) 現象之表面增強拉曼散射法中所用之分子感測用金屬奈米粒子材料及其製造方法。

詳言之，為由使於可見光領域具有表面電漿子吸收之金屬奈米粒子彼此設有特定距離而由 DNA 等之有機分子連結之金屬奈米粒子集合體所構成之分子感測用金屬奈米粒子材料。

### 【先前技術】

作為對於吸附於金屬表面之有機分子所特異發現到之特性有表面增強之拉曼散射 ( Surface Enhanced Raman Scattering: SERS ) 。

所謂 SERS，具體而言，係指藉由金屬粒子彼此接近，而利用粒子表面上之共振效果，引發局部表面電漿子，進而局部表面電漿子誘發增強電場，在該增強電場中使吸附並存在於金屬粒子上之拉曼活性分子 ( 若丹明 ( Rhodamine ) 6G 等之色素有機分子 ) 之拉曼散射增強之現象。

該 SERS 受到矚目之一個理由為即使來自單一分子或單一粒子亦可獲得振動光譜。藉此可檢測出生體分子辨識等之微量化學物質，因此目前其種種研究受到廣泛探討 ( 非專利文獻 1、2、3 ) 。

畢竟拉曼散射其特性上係對於此種微量檢測全然不適合之物理現象。其理由認為如下。

拉曼散射係測定分子與自雷射光發出之光子 ( photon ) 之衝撞所引起。例如於一秒內自波長 488nm 氬雷射所發出之光子數於 1W 輸出時估計約  $2.5 \times 10^{18}$  個。其中可與分子衝撞之光子為  $10^{13} \sim 10^{15}$  個左右，大多數光子均直接通過。就該勉強衝撞之光子之衝撞模式而言，有彈性衝撞及非彈性衝撞兩種。前者在衝撞間並非分子與光子間之能量授受者，以該衝撞模式所引起之散射稱為「雷利散射 ( Rayleigh scattering )」。雷利散射由於光子與分子間並無能量授受，故即使散射光之振動數徹底亦成於等於入射光之波長。上述勉強引起之分子與光子之衝撞大部分為該彈性散射，因此散射光大部分為雷利散射。

另一方面，非彈性散射與彈性散射相反，光子係與分子衝撞，其能量朝分子移動。因此散射光之振動數，與雷利散射係對照入射光之振動數不同。此種散射稱為拉曼散射。尤其雷曼散射光比入射光之振動數大時（光子可自分子獲得能量時）稱為反史托克拉 ( anti-Stokes ) 拉曼散射，相反地，光子對分子賦予能量時稱為史托克拉拉曼散射。引起此種非彈性衝撞之光子為衝撞之光子全體之約  $1/10^7$  左右。相對於如此入射之光子數，引起非彈性衝撞而引起拉曼散射之光子數非常少。因此檢測感度低，迄今作微分析手段使用極少。

然而，進入到 1970 年代，由 W. Holzer 等人（非專利文

獻4) 開始對於有關氣體鹵素分子之共振拉曼散射光譜之測定等多數共振拉曼進行研究並提出報導。由該共振拉曼散射引起之散射強度增大(通常共振拉曼效果所致之強度增強為 $10^3\sim 10^5$ 倍左右)而伴隨之拉曼散射如同曬在腳燈下。所謂共振拉曼,係於使用與某分子之吸收帶重疊之波長之激發光測定拉曼散射時,成為吸收帶原因之發色團部份之振動引起之拉曼能帶強度顯著增大之效果,而可測定數 $\mu\text{M}$ 左右濃度之色素拉曼光譜。

隨後於1977年P.P.Van Duyne等人(非專利文獻5)與J.A. Creighton等人(非專利文獻6)之研究團隊發現獨立之表面增強拉曼散射。實際上,自此以後至3年前Fleischmann等人之研究團隊雖觀測到該現象,但其等並未掌握到散射剖面積與共振拉曼效果同樣增大之想法。

SERS通常為於金屬電極、凝膠、結晶、蒸鍍膜、半導體表面上吸附之某種分子之拉曼散射強度比該分子處於溶液中時更顯著增強之現象,但目前有關該現象之機制尚有諸多不明瞭之處。以金、銀、銅、鉑、鎳等雖已確認到SERS,但目前所了解之SERS特徵,在銀或金中增強效果尤其大。該代表物性顯示如下特性。

- 1) 金屬表面之粗糙度對SERS表顯有某種程度之參與
- 2) SERS光譜一般顯示明確之波長依存性
- 3) SERS強度依存於吸附於金屬表面之分子配向。且依存於與金屬表面之距離。

SERS表面之機制目前提出兩種見解。一種係表面電漿

子模式。該模式被視為係利用激發反射光譜之光照射到金屬表面所產生之表面電漿子之吸收，認為係吸附分子之振動與該表面電漿子激發之耦合而表現者。另一種模式為稱為電荷移動模式者，反射光譜被認為係金屬表面與分子所形成之錯合物之吸收，係利用起因於該吸收之共振拉曼效果而展現SERS之見解。反正，即使目前該機制尚未明瞭，但亦可明瞭由使先前說明之共振拉曼條件與SERS之條件重疊之表面增強拉曼散射，散射強度亦增大至 $10^{11} \sim 10^{14}$ 倍左右，而可大為擴大單一分子分光之可能性。因該感度高故而已開始應用於微量定性分析。

至於應用迄今所提案之SERS的奈米粒子，例如低分子芳香環化合物直接利用靜電相互作用吸附於奈米粒子表面之方法，或於奈米粒子表面吸附具有硫醇末端之若丹明、蔡、喹啉等通訊（reporter）分子者等（非專利文獻7），但已應用作為分子辨識感測器或pH感測器（非專利文獻8）。

至於SERS粒子之合成法，已知有奈米片狀金屬複合體材料合成法（參考專利文獻1）、或於奈米多孔質表面吸附若丹明6G等色素（拉曼活性分子）之方法（參考專利文獻2）、且應用金奈米粒子之例已知有將金奈米棒固定於基板上，用於分析其表面分子之增強拉曼散射者（參考專利文獻3）等。

又，已揭示複數合成有機無機奈米團簇，其包含吸附至複數融合之粒子表面及複數金屬粒子最初所接觸之複數

接合部、形成包含複數拉曼活性有機化合物之金屬團簇之數個該融合或會合之複數金屬粒子（參考專利文獻4）。

〔先前技術文獻〕

〔專利文獻〕

〔專利文獻1〕特開2009-061580號公報

〔專利文獻2〕特開2008-184671號公報

〔專利文獻3〕特開2005-233637號公報

〔專利文獻4〕特表2007-514169號公報

〔非專利文獻〕

〔非專利文獻1〕ACS Nano 2 (4) 612-616, (2008)

〔非專利文獻2〕Anal Chem, 79, 6927-6932, (2007)

〔非專利文獻3〕Anal Chem, 77, 6134-6139, (2005)

〔非專利文獻4〕J. Chem. Phys. 52, 399 (1970)

〔非專利文獻5〕J. Electroanal Chem., 84, 1 (1977)

〔非專利文獻6〕J. Am. Chem. Soc., 99, 5215, (1977)

〔非專利文獻7〕Langmuir 23, 10539-10545 (2007)

〔非專利文獻8〕Nano Lett. Vol17, No.9 2819-2823 (2007)

〔非專利文獻9〕J. Am. Chem. Soc., Vol. 131, 7518-7519, (2009)

## 【發明內容】

〔發明欲解決之課題〕

近幾年來雖已對SERS探討種種應用，但不僅可使用之



基板或表面粗糙度受到限制，進而由於其拉曼強度與拉曼活性分子之配向性有大的依存性，故多半依據場所測定部位而會產生較大偏差，有非常難以求得定量性解析之缺點。

再者使用以往所提案之色素等之低分子系拉曼活性分子時，有關該拉曼活性分子對奈米粒子之吸附過程（靜電吸附過程）中，被認為因奈米粒子表面電荷產生變化，使粒子間之表面電荷排斥力減弱所造成之引起奈米粒子凝集方面將成為問題。奈米粒子之凝集不僅引起拉曼活性分子之脫離，且若在分子辨識前引起吸附拉曼活性分子之奈米粒子之凝集，則雖然是在分子辨識前，但由於出現SERS信號故有誤辨識之情況。尤其在生體環境下，使用該等粒子時，必須確保高鹽濃度下之分散安定性，而有必要對該凝集問題提出解決對策。

〔用以解決課題之手段〕

本發明人等為達上述目的而積極重複檢討之結果，發現藉由預先使用有機分子使金屬奈米粒子彼此成為一定間隔之方式連結而形成金屬奈米粒子集合體，可抑制金屬奈米粒子之凝集或金屬奈米粒子之濃度分佈失去平衡，可穩定地檢測出自金屬奈米粒子彼此之接近界面所生成增強電場所得之表面增強拉曼散射光。

且本發明人等發現，尤其藉由使用DNA作為使金屬奈米粒子彼此連結之有機分子，不僅可容易地使金屬奈米粒

子間之距離成爲所需距離，亦可容易地製造金屬奈米粒子之集合體，因而完成本發明。

亦即本發明之第一目的係關於一種分子感測用金屬奈米粒子材料，其係具備金屬奈米粒子集合體，該金屬奈米集合體係透過有機分子而連結金屬奈米粒子，藉以使3至10個金屬奈米粒子以各相鄰金屬奈米粒子間以特定距離結合而成者，且該集合體係於對其施加之電場內包含拉曼活性分子，而於增強電場中發出來自拉曼分子之經增強的拉曼散射光者。

第二目的係有關第一目的之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述金屬奈米粒子係由在紫外光區域至紅外光區域具有產生表面電漿子（plasmon）共振之共振波長的金屬元素所成。

第三目的係有關第一目的或第二目的之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述金屬奈米粒子爲具有1nm至100nm之平均粒徑之粒子。

第四目的係有關第一目的至第三目的之任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述金屬奈米粒子集合體中，所連結之金屬奈米粒子與其兩相鄰金屬奈米粒子間並非結合於一直線上。

第五目的係有關第一目的至第四目的之任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述有機分子於末端具有硫醇基或胺基，且包含核酸、聚乙二醇或碳氫化物。

第六目的係有關第五目的之分子感測用金屬奈米粒子

材料，其中前述有機分子為具有3至40之鹼基數，且於末端具有硫醇基或胺基之核酸。

第七目的係有關第六目的之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述核酸為DNA。

第八目的係有關第一目的至第七目的之任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其係由前述拉曼活性分子結合於前述有機分子上而成。

第九目的係有關第一目的至第八目的之任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其係由前述金屬奈米粒子於其金屬奈米粒子表面結合有至少一個以上之分子辨識探針分子而成。

第十目的係有關第一目的至第九目的之任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述分子辨識探針分子為於末端具有硫醇基或胺基，且透過核酸、聚乙二醇或碳氫化物而結合分子辨識探針之分子。

第十一目的係有關一種第一目的至第十目的之任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其包含下列步驟：

a) 於成爲基體之單鏈核酸鏈(1)上，至少融合兩條與該核酸鏈(1)中之部分鹼基構造具有互補性且於一末端具有硫醇基之單鏈核酸鏈(2)而獲得形成雙螺旋之變性核酸鏈之步驟；

b) 使前述變性核酸鏈之硫醇基與金屬奈米粒子反應，於該金屬奈米粒子表面上結合變性核酸鏈後，於

60~100°C 加熱使變性核酸鏈之雙螺旋構造解離因而去除單鏈核酸鏈 (1)，獲得透過硫醇基結合有單鏈核酸鏈 (2) 之金屬奈米粒子 (1) 之步驟；

c) 使與前述核酸鏈 (2) 具有互補性、且於一末端具有硫醇基之鹼基鏈長相等之單鏈核酸鏈 (3) 與金屬奈米粒子反應，獲得透過硫醇基結合有單鏈核酸鏈 (3) 之金屬奈米粒子 (2) 之步驟；

d) 使結合有單鏈核酸鏈 (2) 之金屬奈米粒子 (1) 與結合有單鏈核酸鏈 (3) 之金屬奈米粒子 (2) 混合，而製造使單鏈核酸鏈 (2) 與單鏈核酸鏈 (3) 融合形成雙螺旋之金屬奈米粒子集合體之步驟；

進而包含於前述 a) 步驟中使用之單鏈核酸鏈 (2) 或前述 c) 步驟中使用之單鏈核酸鏈 (3) 或其兩者上結合拉曼活性分子之步驟。

第十二目的係有關一種第一目的至第十目的之任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其包含下列步驟：

a) 於成爲基體之單鏈 DNA 鏈 (1) 上，至少融合兩條與該 DNA 鏈 (1) 中之部分鹼基構造具有互補性且於一末端具有硫醇基之單鏈 DNA 鏈 (2) 而獲得形成雙螺旋之變性 DNA 鏈之步驟；

b) 使前述變性 DNA 鏈之硫醇基與金屬奈米粒子反應，於該金屬奈米粒子表面上結合變性 DNA 鏈後，於 60~100°C 加熱使變性 DNA 鏈之雙螺旋構造解離因而去除單

鏈 DNA 鏈 ( 1 ) ， 獲得透過硫醇基結合有單鏈 DNA 鏈 ( 2 ) 之金屬奈米粒子 ( 1 ) 之步驟；

c) 使與前述 DNA 鏈 ( 2 ) 具有互補性、且於一末端具有硫醇基之鹼基鏈長相等之單鏈 DNA 鏈 ( 3 ) 與金屬奈米粒子反應，獲得透過硫醇基結合有單鏈 DNA 鏈 ( 3 ) 之金屬奈米粒子 ( 2 ) 之步驟；

d) 使結合有單鏈 DNA 鏈 ( 2 ) 之金屬奈米粒子 ( 1 ) 與結合有單鏈 DNA 鏈 ( 3 ) 之金屬奈米粒子 ( 2 ) 混合，而製造使單鏈 DNA 鏈 ( 2 ) 與單鏈 DNA 鏈 ( 3 ) 融合形成雙螺旋之金屬奈米粒子集合體之步驟；

進而包含於前述 a) 步驟中使用之單鏈 DNA 鏈 ( 2 ) 或前述 c) 步驟中使用之單鏈 DNA 鏈 ( 3 ) 或其兩者上結合拉曼活性分子之步驟。

第十三目的係有關第十二目的之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其中前述步驟 d) 中，相對於該鏈結有單鏈 DNA 鏈 ( 2 ) 之金屬奈米粒子 ( 1 ) 之 1 當量，使用 2 當量之該鏈結有單鏈 DNA 鏈 ( 3 ) 之金屬奈米粒子 ( 2 ) 而製造金屬奈米粒子集合體。

第十四目的係有關第十二目的或第十三目的之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其中前述單鏈 DNA 鏈 ( 2 ) 係不帶有具有相互互補性之部位者。

第十五目的係有關第十二目的至第十四目的之任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其中於 a) 至 d) 中之任一步驟中，進而包含下述步驟：

e) 使於包含核酸、聚乙二醇或碳氫化物之分子鏈一末端具有分子辨識探針且於另一端具有硫醇基或胺基之分子辨識探針分子與金屬奈米粒子反應，而於金屬奈米粒子表面上透過硫醇基或胺基於末端結合分子辨識探針分子之步驟。

第十六目的係有關一種分子感測方法，其特徵為使第一目的至第十目的之任一項之之分子感測用金屬奈米粒子材料與檢體接觸後，進行檢體之拉曼散射測定。

第十七目的係有關第十六目的之分子感測方法，其係由前述分子感測用金屬奈米粒子材料固定於基板上而成。

[ 發明效果 ]

本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料，由於係使金屬奈米粒子間以特定間隔連結而成之金屬奈米粒子集合體所成，故可使在金屬奈米粒子之界面形成之增強電場強度成爲一定，可防止在先前技術中成爲問題之因SERS粒子之凝集或濃度部分佈失去均衡所引起之誤認檢測，且可避免因表面狀態所致之SERS信號之變動，因此可穩定地檢測出表面增強拉曼散射光。

且，本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料，藉由於該金屬奈米粒子集合體之金屬奈米粒子表面，連結生物素等分子辨識探針，而可辨識目的檢體。

因此，藉由使用本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料，可穩定地保持達到通常拉曼散射強度之10的11次方倍

的表面增強拉曼散射強度，故即使對濃度極稀的檢體亦可有效地檢測。

再者，依據本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，僅使表面增強拉曼散射活性粒子的金、銀、銅、鉑或鎳等金屬奈米粒子藉末端具有硫醇基或胺基之單鏈DNA進行鏈修飾者與藉與該DNA鏈有互補鏈關係之於末端具有硫醇基之另一單鏈DNA進行鏈修飾者予以混合，可容易地製造在金屬奈米粒子間形成結合之金屬奈米粒子集合體。

且，由於金屬奈米粒子間之距離可藉由調整DNA之鹼基數而自由控制，故可製造以發生最強增強電場之距離使金屬奈米粒子彼此連結之金屬奈米粒子集合體。

再者，藉由於該金屬奈米粒子集合體之金屬奈米粒子表面，連結對目的檢體具有強的相互作用之分子（分子辨識探針分子），而可合成可辨識目的檢體之SERS活性分子辨識粒子。

#### 【實施方式】

本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料具備金屬奈米粒子集合體，該金屬奈米集合體係透過有機分子使金屬奈米粒子彼此連結，藉以使3至10個金屬奈米粒子以各相鄰金屬奈米粒子間以特定距離結合而成者，且該集合體係於對其施加之電場內包含拉曼活性分子者。

本發明所用之金屬奈米粒子並未特別限制，可舉例為

由在紫外線區域至紅外線區域具有產生表面電漿子共振之共振波長之金屬元素所成，例如由自金、銀、銅、鉑、鎳、鋁等選擇之金屬元素所成之粒子。其中較好使用金奈米粒子。

上述金屬奈米粒子宜具有1nm至500nm，較好1nm至100nm，更好5nm至100nm，最好5nm至20nm之平均粒徑。

至於用於使金屬奈米粒子彼此連結之有機分子，可使用由核酸、聚乙二醇或烴等之有機化合物所成之分子鏈，該等有機分子於末端具有硫醇基或胺基作為用以連結至金屬奈米粒子（表面）之基。

其中核酸（尤其是DNA）可藉由調整鹼基數而成為具有所需分子鏈長之有機分子，亦即，可容易地將金屬奈米粒子間之距離調整至所需長度，故而最佳。此情況下，核酸之鹼基數之數值範圍較好為3鹼基至40鹼基，更好為3至20鹼基，例如較好使用12鹼基長之DNA。

且前述有機分子中，除了用以將金屬奈米粒子間之距離調整至特定間隔所用之化合物（DNA等）以外，較好結合前述之拉曼活性分子（亦稱為拉曼探針）。拉曼活性分子除了例如若丹明6G（R6G）、結晶紫（CRV）、香豆素等色素有機分子以外，亦舉例有連結數個芳香環之縮合環化合物。該等拉曼活性分子係導入有機分子之各末端。

利用前述有機分子連結之金屬奈米粒子之個數，如前述，較好為3至10個。此係由於在相近之2個金屬粒子間誘發之增強電場係隨2個粒子之運動而改變方向之故，通常



朝向發出最適增強磁場之方向並無限定，對即使粒子運動亦發生最適增強電場而言，以對於由2個粒子間形成之有機分子之結合方向，具有包含 $180^\circ$ 以下之結合方向之有機分子再結合粒子而作成3個粒子以上之集合體形態係較佳之故。但，於該等3個粒子集合體中結合由更多有機分子及金屬粒子所成之集合體，由於在檢測場面亦會發生標記化部份之濃度差異故而不佳，因此金屬粒子集合體最多較好使10個粒子左右之金屬粒子藉有機分子予以結合者。

因此，於金屬奈米粒子集合體中，連結之金屬奈米粒子與其兩相鄰之金屬奈米粒子之間非以一直線結合，亦即，較好3個金屬奈米粒子間之2個有機分子以具有 $180^\circ$ 以下，例如 $10$ 至 $160^\circ$ 之角度，與正中央之金屬奈米粒子進行連結。

又，前述金屬奈米粒子集合體中之金屬奈米粒子（表面），亦可進而具有可辨識目的檢體之分子辨識探針分子。藉此，辨識檢體後藉由進行拉曼散射測定，可進行目的檢體之檢測。

分子辨識探針分子為例如於具有與上述作為有機分子使用之核酸（DNA）不同之鹼基序列之核酸（DNA）、聚乙二醇或包含烴之分子鏈之一末端導入分子辨識探針（生物素等；亦稱為檢測部位），於另一末端導入與金屬奈米粒子表面具有結合能之硫醇基、胺基等之分子。因此透過該硫醇基，可使分子辨識探針分子結合於金屬奈米粒子（表面）。

本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法包含以下之 a) 至 d) 步驟。

a) 於成爲基體之單鏈核酸鏈 (1) 上，至少融合兩條與該核酸鏈 (1) 中之部分鹼基構造具有互補性且於一末端具有硫醇基之單鏈核酸鏈 (2) 而獲得形成雙螺旋之變性核酸鏈之步驟；

b) 使前述變性核酸鏈之硫醇基與金屬奈米粒子反應，於該金屬奈米粒子表面上結合變性核酸鏈後，於 60~100°C 加熱使變性核酸鏈之雙螺旋構造解離因而去除單鏈核酸鏈 (1)，獲得透過硫醇基結合有單鏈核酸鏈 (2) 之金屬奈米粒子 (1) 之步驟；

c) 使與前述核酸鏈 (2) 具有互補性、且於一末端具有硫醇基之鹼基鏈長相等之單鏈核酸鏈 (3) 與金屬奈米粒子反應，獲得透過硫醇基結合有單鏈核酸鏈 (3) 之金屬奈米粒子 (2) 之步驟；

d) 使結合有單鏈核酸鏈 (2) 之金屬奈米粒子 (1) 與結合有單鏈核酸鏈 (3) 之金屬奈米粒子 (2) 混合，而製造使單鏈核酸鏈 (2) 與單鏈核酸鏈 (3) 融合形成雙螺旋之金屬奈米粒子集合體之步驟。

本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法中，上述核酸較好爲 DNA，亦即分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法係包含以下之 a) 至 d) 步驟。

a) 於成爲基體之單鏈 DNA 鏈 (1) 上，至少融合兩條與該 DNA 鏈 (1) 中之部分鹼基構造具有互補性且於一末

端具有硫醇基之單鏈 DNA 鏈 (2) 而獲得形成雙螺旋之變性 DNA 鏈之步驟；

b) 使前述變性 DNA 鏈之硫醇基與金屬奈米粒子反應，於該金屬奈米粒子表面上結合變性 DNA 鏈後，於 60~100°C 加熱使變性 DNA 鏈之雙螺旋構造解離因而去除單鏈 DNA 鏈 (1)，獲得透過硫醇基結合有單鏈 DNA 鏈 (2) 之金屬奈米粒子 (1) 之步驟；

c) 使與前述 DNA 鏈 (2) 具有互補性、且於一末端具有硫醇基之鹼基鏈長相等之單鏈 DNA 鏈 (3) 與金屬奈米粒子反應，獲得透過硫醇基結合有單鏈 DNA 鏈 (3) 之金屬奈米粒子 (2) 之步驟；

d) 使結合有單鏈 DNA 鏈 (2) 之金屬奈米粒子 (1) 與結合有單鏈 DNA 鏈 (3) 之金屬奈米粒子 (2) 混合，而製造使單鏈 DNA 鏈 (2) 與單鏈 DNA 鏈 (3) 融合形成雙螺旋之金屬奈米粒子集合體之步驟。

接著進而，本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法中，除上述 a) 至 d) 步驟以外，包含於前述 a) 步驟中使用之單鏈 DNA 鏈 (2) 或前述 c) 步驟中使用之單鏈 DNA 鏈 (3) 或其兩者上結合拉曼活性分子之步驟。

上述步驟中使用之單鏈 DNA 鏈 (2) 可為 DNA 鏈 (2) 彼此具有互補性者，但較好非單鏈 DNA 鏈 (2) 彼此具有互補性者亦較好。此係因為與金屬奈米粒子反應形成結合有單鏈 DNA 鏈 (2) 之金屬奈米粒子 (1) 之際，若 DNA 鏈 (2) 為互相具有互補性者，則有形成粒子 (1) 彼此之融

合體之虞，係爲了防止凝集發生。

又，單鏈 DNA 鏈（2）與單鏈 DNA 鏈（3）之分子鏈長（亦即鹼基鏈長）可爲不同，但較好爲等長。

且上述步驟中使用之金屬奈米粒子（1）與金屬奈米粒子（2）中使用之金屬可爲相同金屬種，亦可爲不同金屬種，但宜較好使用相同金屬種。

上述 a）步驟中，與成爲基體之單鏈 DNA 鏈（1）融合之 2 條 DNA 鏈（2）之 2 個硫醇基間之距離，對應於 b）步驟所得之金屬奈米粒子（1）上形成之 DNA 鏈（2）之結合位置。

此處，若於隔著金屬奈米粒子互爲相反側之位置結合有 2 條 DNA 鏈（2），則 3 個金屬奈米粒子，亦即金屬奈米粒子（1）與隨後 d）步驟中於該 DNA 鏈（2）上融合有 DNA 鏈（3）而結合之 2 個金屬奈米粒子（2）之 3 個粒子將成爲直線狀連結。亦即，於該等 3 個金屬奈米粒子間形成之 2 個增強電場所成之角度成爲  $180^\circ$ ，如前述係不佳。

因此，調整 DNA 鏈之鏈長或金屬奈米粒子之大小（平均粒徑），而將 3 個金屬奈米粒子之排列（角度）調整至較佳角度具重要性。

上述 d）步驟，亦即利用金屬奈米粒子（1）與金屬奈米粒子（2）之混合而製造金屬奈米粒子集合體之步驟，係藉由對金屬奈米粒子（1）添加過量金屬奈米粒子（2）而進行。例如金屬奈米粒子（1）與金屬奈米粒子（2）以 1：2~10 左右之當量比混合，藉此使 DNA 鏈（2）及 DNA 鏈

(3) 融合而形成雙螺旋，形成兩個金屬奈米粒子間以有機分子 (DNA等) 予以結合。

例如，較好為由2當量之具有單鏈DNA鏈(2)之一個金屬奈米粒子(1)與1當量之具有單鏈DNA鏈(3)之2個金屬奈米粒子(2)混合而獲得之3個金屬奈米粒子所構成之金屬奈米粒子集合體。

如此獲得之金屬奈米粒子彼此以等間隔連結之金屬奈米粒子集合體可發出表面增強拉曼散射而有作為分子感測金屬奈米粒子材料之功能。

以下，針對本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料中所用之金屬奈米粒子集合體之製造方法，使用圖1之具體例加以說明。本方法可仿效非專利文獻9所示之方法實施。

準備圖1中以編號1、2、3表示之3種DNA(以下分別稱為DNA1、DNA2、DNA3)。DNA1及DNA2各為處於互補鏈關係之DNA，DNA3為於中央部組入雙鏈但其兩端與DNA1及DNA2有互補鏈關係之鹼基鏈。且DNA1及DNA2於其末端具有硫醇基。

接著使DNA1、DNA2及DNA3混合，合成如圖1中以編號4表示之變性DNA。將所合成之變性DNA4與金奈米粒子5膠體溶液混合，成為於金奈米粒子表面透過硫醇基而結合之於圖1中以編號6表示之鏈結有DNA之金奈米粒子。接著，將溶液加溫(依據鹼基數設定適當溫度)，使雙鏈解離，合成圖1中以編號7表示之鏈結有DNA1及DNA2之金屬

奈米粒子。

相對於此，將預先在金奈米粒子表面透過硫醇基結合有包含拉曼活性分子之DNA1及DNA2之金奈米粒子8及9添加於圖1中以編號7表示之金奈米粒子，藉此以DNA彼此組入雙鏈，而完成圖1中以編號10表示之金粒子接合。此情況下，金粒子彼此可固定於完全受控制之位置。

上述之本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料與檢體接觸之後，藉由測定檢體之拉曼散射測定，而成爲可用於分子感測之方法。

此時，前述分子感測用金屬奈米粒子材料亦可固定於基板上。

本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料，如前述，藉由使用金屬奈米粒子以特定間隔結合之金屬奈米粒子集合體，可控制於金屬奈米粒子界面所形成之增強電場，亦即，可在金屬奈米粒子表面形成穩定的增強電場，而可使一定的拉曼散射強度穩定化。因此爲改良如以往之拉曼散射不穩定之非常有用技術。

#### 〔實施例〕

以下，針對本發明，使用實施例更具體且詳細加以說明，但本發明並不限定於該等。

下文中之鹼基序列中之簡寫爲腺嘌呤（A）、鳥嘌呤（G）、胸苷（T）、胞嘧啶（C）、硫醇基（HS或SH）。

[ 例 1 對金奈米粒子固定硫醇末端 DNA ]

首先，分別準備有互補鏈關係之單股 DNA ( a ) 及 ( b ) 。

( a ) 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3'

鹼基序列係於 GCCACCAGCTCC 之 12 個鹼基中，作為固定於金表面之部位的硫醇基係透過碳原子數 6 之烷基鏈 ( C<sub>6</sub> ) 結合至 5' 末端，且作為拉曼活性分子 ( 拉曼探針 ) 之色素的若丹明 ( TAMRA ) 係透過碳原子數 6 之烷基鏈 ( C<sub>6</sub> ) 結合至 3' 末端。

( b ) 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3'

鹼基序列係於 GGAGCTGGTGGC 之 12 個鹼基中，作為固定於金表面之部位的硫醇基係透過碳原子數 6 之烷基鏈 ( C<sub>6</sub> ) 結合至 5' 末端。

該等單股 DNA ( a ) 及 ( b ) 各獨立添加於金奈米粒子溶液 ( 金膠體溶液 ) 中，藉此結合於金奈米粒子表面，但由於該等 DNA 之末端硫醇基並不穩定，周圍之硫醇基彼此容易結合而形成 S-S 鍵，因此在將 DNA 固定於金表面之前，有必要以還原劑將形成之 S-S 鍵預先還原成硫醇基。關於該還原方法並未特別限定，但作為其一例，此次係利用如下順序還原 S-S 鍵。

亦即，自 100 pmol/μL 之 5'-硫醇化 DNA 之 DTT ( 二硫蘇糖醇 ) 溶液採取 50 μL 至 1.5 mL 之微量管中，添加 20 μL 之 2.5 M NaCl，冷卻至 -20℃ 添加乙醇 950 μL，在 -80℃ 放置 20 分鐘。隨後以 12,000 旋轉、4℃ 離心 10 分鐘，捨棄上澄液，

以 50 $\mu$ L 之 TE 溶液（參 -EDTA 緩衝液：10mM 三羥基甲基胺基甲烷、1mM EDTA，pH~8）再溶解，作成純化之硫醇化 DNA。

至於將 DNA 朝金奈米粒子之固定（結合）化操作並未特別限定，但此次使用如下方法進行。

亦即，於金奈米粒子溶液 1mL 中添加於上述方法使 S-S 鍵還原之經純化之硫醇化 DNA 5nmol。此時硫醇化 DNA 之最終濃度為 5 $\mu$ L。

添加後，容器使用渦流混合機攪拌 5 分鐘，隨後，於 50 $^{\circ}$ C 恆溫槽中放置 4 小時至 24 小時，促進 DNA 朝金奈米粒子表面之固定化。此時金奈米粒子表面不僅有硫醇基結合，亦由於引起 DNA 鹼基之吸附故無法成為緻密吸附狀態。因此，於金奈米粒子與硫醇化 DNA 溶液中，添加 40 $\mu$ L 之 2.5M NaCl 及 20 $\mu$ L 之 500mM 磷緩衝液，以使 NaCl 及磷酸緩衝液（pH7）最終濃度成為 0.1M 及 10mM 之方式，再於 50 $^{\circ}$ C 放置 40 小時。

#### [ 例 2 金奈米粒子集合體之製作 ]

以上述方法分別固定有彼此互補鏈之 DNA 之 2 種金奈米粒子溶液每次量取 0.5mL 至微量管中，在 14,000rpm 進行離心 25 分鐘，隨後，去除上澄液，以 10mM 磷酸緩衝液（含 0.1M NaCl，pH7）再分散。此時，雖有疑似凝集，但該情況下在 50 $^{\circ}$ C 加溫片刻，即可再分散。此操作再重複一次，除去上澄液後，於 0.01% Tween-20 1 $\mu$ L、0.1M NaCl（



10mM磷酸緩衝液，pH7) 0.25mL中再分散。

將如此所得之於表面結合有DNA之2種金奈米粒子分散溶液混合，藉由DNA之互補鏈融合，形成金奈米粒子間之結合，而製造金屬奈米粒子集合體。

亦即，首先於PCR管中，添加1% Tween-20 1 $\mu$ L、DNA修飾之金奈米粒子5 $\mu$ L（有互補關係之修飾粒子各為5 $\mu$ L）、5M NaCl 4 $\mu$ L，在室溫放置10分鐘，且於未見到金奈米粒子集合體形成（看起來像凝集體）時，以冰冷卻並放置20分鐘以上後，以桌上型離心機輕微離心，使所得集合體沉澱。

又，金奈米粒子集合體亦可藉由首先於PCR管中，添加1% Tween-2 1 $\mu$ L、DNA修飾之金奈米粒子5 $\mu$ L、與前述修飾用之DNA有互補關係之1 $\mu$ M DNA 10 $\mu$ L、5M NaCl 4 $\mu$ L，在室溫放置10分鐘（於未見到金奈米粒子集合體形成（看起來像凝集體）時，以冰冷卻並放置20分鐘以上後），以桌上型離心機輕微離心，使所得集合體沉澱而獲得。

[ 例3 金奈米粒子集合體之解析（1）：集合體形成之解析 ]

對於所得金屬奈米粒子集合體，以透射型電子顯微鏡及原子間力顯微鏡加以解析。

首先，分別將結合有前述單股DNA（a）〔5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3'〕之金奈米粒子之透射型電子顯微鏡像的圖示於圖2，將鍵結有單股DNA（b）〔5'-

HS -C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3'之金奈米粒子之透射型電子顯微鏡像的圖示於圖 3，接著將該等金奈米粒子混合所得之金奈米粒子集合體之透射型電子顯微鏡像的圖示於圖 4。

且，分別將結合有前述單股 DNA ( b ) [ 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' ] 之金奈米粒子之原子間力顯微鏡像的圖示於圖 5，將結合有前述單股 DNA ( b ) 之金奈米粒子與結合有前述單股 DNA ( a ) [ 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3' ] 之金奈米粒子混合所得之金奈米粒子集合體之原子間力顯微鏡像的圖示於圖 6。

如圖 4 及圖 6 所示，藉由混合單分散狀態之 2 種金奈米粒子，可形成集合體，而可利用透射型電子顯微鏡及原子間力顯微鏡加以確認。

[ 例 4 金奈米粒子集合體之解析 ( 2 ) : 增強電場之測定 ]

接著，使用近場微顯微鏡同時進行鄰接之金奈米粒子界面中所形成之增強電場之測定及形狀測定。

分別將結合有前述單股 DNA ( b ) [ 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' ] 之金奈米粒子之近場顯微鏡所得之像 ( 位置資訊，圖 7 中符號 11 ) 及在其表面附近形成之電場 ( 圖 7 中符號 12 ) 示於圖 7，將結合有前述單股 DNA ( b ) 之金奈米粒子與結合有前述單股 DNA ( a ) [ 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3' ] 之金奈米粒子混合所得之金奈米粒子集合體之近場顯微鏡所得之像 ( 位置資訊，

圖 8 中符號 13) 及在其表面附近形成之電場 (圖 8 中符號 14) 示於圖 8。

如圖 7 及圖 8 所示，確認由形成有金奈米粒子集合體之粒子獲得非常強的增強電場，結果可期待由該增強電場中所含之拉曼活性分子獲得非常強的拉曼散射。

[ 例 5 金奈米粒子集合體之解析 (3) : 拉曼光譜測定 ]

接著將所得金奈米粒子集合體 (溶液) 封入石英製之毛細管中，測定該毛細管內之溶液的拉曼光譜。又，本實驗所用之 12 鹼基 DNA 由於在 90°C 以上之溫度 DNA 的融合會解離，恢復成單股 DNA，因此亦同時在 90°C 以下的溫度進行拉曼光譜之測定。在相當於生體溫度之溫度 (約 34~38°C) 測定之拉曼光譜結果 (金奈米粒子集合體) 於圖 9 中以符號 15 表示，在 90°C 之溫度下之拉曼光譜結果 (結合有單股 DNA 之金奈米粒子) 於圖 9 中以符號 16 表示。

如由圖 9 所明瞭，自形成集合體之金奈米粒子觀察到強的拉曼散射。其可說是如圖 10 所示之由於金奈米粒子彼此之集合 (結合) · 解離狀態係隨著溫度變化而產生可逆變化所致者。

[ 例 6 含有分子辨識探針之金奈米粒子集合體之製作及分子辨識 ]

將如此所得之金奈米粒子集合體之金屬奈米粒子表面，進而以可辨識特定分子之分子辨識探針加以修飾。該方

法並無特別限定者，但於先前所示之在金奈米粒子表面上固定DNA時，一般係預先混合。

亦即，首先於PCR管中加入1% Tween-20 1 $\mu$ L、DNA修飾之金奈米粒子5 $\mu$ L、於與前述DNA修飾之金奈米粒子之修飾中所用之DNA有互補鏈關係之1 $\mu$ M DNA 10 $\mu$ L中以10質量%之比例混合有於單末端具有烷基胺基於另一末端具有生物素之雜二官能基PEG（分子量5,000）之溶液、5M NaCl 4 $\mu$ L，在室溫放置10分鐘（於未見到金奈米粒子集合體形成（看起來像凝集體）時，以冰冷卻並放置20分鐘以上後），以桌上型離心機輕微離心，使所得集合體沉澱。

將如此所得之含有分子辨識探針之拉曼感測用金奈米粒子集合體添加於鏈黴親合素（Streptavidin）·盤中，在室溫放置數分鐘後，以滅菌水洗淨數次，將含有未固定之分子辨識探針之拉曼感測用金奈米粒子集合體充分洗淨至金之電漿子吸收從淨水中消失為止。經如此處理之鏈黴親合素·盤以雷射拉曼顯微鏡觀察後，獲得如圖11所示之拉曼散射光譜，顯示由含有分子辨識探針之拉曼感測用金奈米粒子集合體可辨識分子。

〔實驗例1 金奈米粒子集合體之製造及分子辨識〕

<DNA調製>

準備兩種單鏈DNA。

首先，對於鹼基序列為TTTCTATTCCTA CCAATGTAG CGACTACCTCAG之33鹼基之5'末端，透過碳數6之烷基鏈

結合作為固定於金表面之部位的硫醇基，而合成 DNA。

另一方面，與此不同地，對於鹼基序列為 TTTTCGATCTAATACAGTTAGTTAGTATACG TGC 之 33 個鹼基之 5' 末端，透過碳數 6 之烷基鏈結合作為固定於金表面之部位的硫醇基，而合成 DNA。

接著，將上述單鏈 DNA 之 2 個作為成為用以固定於金屬奈米粒子之模板的單鏈 DNA，準備由具有對上述單鏈 DNA 具有互補關係之部位的鹼基群與上述 2 個單鏈 DNA 之間隔經控制之鹼基群所構成之單鏈 DNA。

亦即，合成自 5' 末端起為 CTGAGGTTAG TCGCTACAT TGGTAGGAATAGGATTGCATGGGATACTATACTGCACAGGCTTAC 之 65 鹼基之 DNA，作為與先前所示之 DNA 結合之互補 DNA。

且合成自 5' 末端起為 GCACGTATACTAACTAAC TGTATTAGATCGGTAAGCCTGTGCAGTGTATAGTATCCCATGCAATC 之 65 鹼基之 DNA，作為與後文所示之 DNA 結合之互補 DNA。

以上，合成之硫醇基末端 33 鹼基 DNA 及 65 鹼基 DNA 之構造如下。

1: 5' -HS-C<sub>6</sub>-TTTCTATTCTACCAATGTAGCGACTACCT  
CAG-C<sub>6</sub>-TAMRA-3'

2: 5' -HS-C<sub>6</sub>-TTTCGATCTAATACAGTTAGTTAGTATACG  
TGC-3'

3: 5' -CTGAGGTTAGTCGCTACATTGGTAGGAATAGGATTG

CATGGGA TACTATACACTGCACAGGCTTAC-3'  
4:5'-GCACGTATACTAACTAACTGTATTAGATCGGTAAG  
CCTGTG CAGTGTATAGTATCCCATGCAATC-3'

<雙鏈DNA之製造>

該等4種DNA以各互補鏈之關係作為雙鏈構造予以結合。其方法並無限定者，但此次使用如下方法進行。

亦即，將上述1至4之DNA以各分別成為濃度 $10\mu\text{M}$ 之方式溶解於純水中，溶解後，分別以DNA1：DNA3=9：10及DNA2：DNA4=9：10之體積比例置入微量管中並混合。於其中添加含有 $300\text{mM}$ 之NaCl之 $30\text{mM}$ 三羥基甲基胺基甲烷-鹽酸（pH8）緩衝液，以使最終濃度成為 $100\text{mM}$  NaCl之方式進行調整。將試料管在 $90^\circ\text{C}$ 加熱放置10分鐘後，以冷卻速度 $-1^\circ\text{C}/\text{分鐘}$ 冷卻至 $30^\circ\text{C}$ 並融合，該等DNA利用電泳法進行分離純化。

<DNA對金粒子之吸附（1）：吸附1個DNA之金奈米粒子>

在微量管內，於金奈米粒子分散液（British BioCell International, Ltd.製：粒徑： $15\text{nm}$ ） $120\mu\text{L}$ 中，混合預先調整之無水雙（對-磺酸酯基苯基）苯基膦二鉀鹽溶液（ $10\text{mg}/\text{mL}$ 水溶液，稱為BSPP） $12\mu\text{L}$ ，形成表面以BSPP塗覆之金奈米粒子。該混合溶液在 $4^\circ\text{C}$ 以 $21,600\text{G}$ 離心1小時，捨棄上澄液，最終為 $10\mu\text{L}$ 。

將該濃縮之金奈米粒子分散液與 $2\mu\text{L}$ 三-硼酸鹽-EDTA

( 稱爲 TBE ) 緩衝液 (  $0.5 \times \text{TBE}$  , 含有  $1.4 \text{ M NaCl}$  ) 混合。

對該溶液  $4 \mu\text{L}$  添加  $2 \mu\text{L}$  之硫醇末端 DNA (  $2 \mu\text{M}$  ) ( 先前所示之 DNA1 或 DNA2 ) 並混合。混合後，以  $0.5 \times \text{TBE}$  ( 含有  $100 \text{ mM NaCl}$  ) 調整至最終體積爲  $8 \mu\text{L}$  , 該混合溶液在室溫 (  $22^\circ\text{C}$  ) 放置 24 小時。放置後，混合 BSPP (  $0.25 \text{ mg/mL}$  溶液 )  $250 \mu\text{L}$  , 以  $4^\circ\text{C}$  、 1 小時、  $21,600 \text{ G}$  離心沉降，捨棄上澄液，去除未反應 DNA。

<DNA 對金粒子之吸附 ( 2 ) : 吸附 2 個 DNA 之金奈米粒子 >

使用與上述 ( 1 ) 同樣方法，調製 BSPP 塗覆之  $15 \text{ nm}$  金奈米粒子。將先前於 <雙鏈 DNA 之製造> 中合成之雙鏈構造之純化 DNA，以莫耳比 ( 金奈米粒子溶液 ) : ( DNA 溶液 ) =  $5 : 1$  , 在  $0.5 \times \text{TBE}$  緩衝液 ( BSPP :  $1 \text{ mg/mL}$  ,  $\text{NaCl}$   $166 \text{ mM}$  ) 中混合。混合後在室溫放置 24 小時，在金粒子表面固定 DNA。隨後，於 BSPP 溶液 (  $0.25 \text{ mg/mL}$  溶液 ) 之稀釋溶液中，保持在  $40^\circ\text{C}$  , 藉此使雙鏈裂解，利用離心純化 (  $4^\circ\text{C}$  , 1 小時 ,  $21,600 \text{ G}$  ) 而純化。

<金奈米粒子集合體之調製 >

使於 DNA 對金奈米粒子之吸附 ( 1 ) 及 ( 2 ) 所調製之吸附 DNA 之金奈米粒子分散液 ( a : 吸附 DNA1 之金奈米粒子 , b : 吸附 DNA2 之金奈米粒子 , c : 吸附 DNA1 及 DNA2 之金奈米粒子 ) 以 a : b : c =  $1 : 1 : 10$  之體積比混合，於室

溫放置 24 小時。放置後離心純化（ $-4^{\circ}\text{C}$ ，10 分鐘， $10,000\text{G}$ ），去除未固定之金奈米粒子。所得金奈米粒子集合體之透射型電子顯微鏡像示於圖 12。

若依此，確認結合 3 個金奈米粒子。亦即，c 粒子過量添加，獲得 a 粒子 - c 粒子 - b 粒子以非直線狀 3 個結合之集合體。此時於所得之金奈米粒子之粒子界面形成之電場具有與先前例 4 之試驗所得結果相同之強度。

<含有分子辨識探針之金奈米粒子集合體之製造及分子辨識>

以對於上述所得金奈米粒子集合體溶液為 10 質量 % 之比例，混合作為分子辨識探針分子之於單末端具有烷基胺基於另一末端具有硫醇基之雜 2 官能基 PEG（分子量 5,000， $100\text{mM}$ ），在室溫放置 2 小時。隨後，利用離心純化除去為吸附之感測探針。

將如此獲得之含有分子辨識探針之金奈米粒子集合體添加至鏈黴親合素·盤中，於室溫放置數分鐘後，以滅菌水洗淨數次，洗淨未固定之含有分子辨識探針之金奈米粒子，進行充分洗淨至今之電漿子吸收從洗淨水中消失。經如此處理之鏈黴親合素·盤以雷射拉曼顯微鏡觀察後，獲得如圖 13 所示之拉曼散射光譜，確認由含有分子辨識探針之金奈米粒子可辨識分子。

[ 實施例 2 ]



準備以下所示3種DNA (DNA5、6、7、8、9、10)。

DNA5; 5'-HS-TTTCTATTCCTACCAATGTAGCGACTACC  
TCAGTTTTTTT-3'

DNA6; 5'-HS-TTTCGATCTAATACAGTTAGTTAGTATAC  
GTGCTTTTTTT-3'

DNA7; 5'-CTGAGGTAGTCGCTACATTGGTAGGAATAGGA  
TTGCATGGGATAC-3'

DNA8; 5'-GCACGTATACTAACTAACTGTATTAGATCGGT  
ATCCCATGCAATC-3'

DNA9; 5'-HS-TCTGAGGTAGTCGCTACATTGGTAGG-C6-  
TAMRA-3'

DNA10; 5'-HS-TGCACGTATACTAACTAACTGTATTA-C6-  
TAMRA-3'

將此使用與上述〔實施例1〕所示者同樣方法，使DNA7及DNA8融合作成中央部分成爲雙鏈之DNA鏈（相當於圖1中，中央部分成爲雙鏈之DNA3），進而使DNA5及DNA6作用於該DNA鏈之兩末端之單鏈部分組成雙鏈（相當於圖1中之變性DNA4）。組成雙鏈之條件完全依據實施例1進行。

將該雙鏈DNA鏈之5nmol添加於金奈米粒子溶液1mL中。添加後，將容器使用渦流混合器攪拌5分鐘，隨後，於50℃恆溫槽中放置4小時至24小時，促進雙鏈DNA鏈透過硫醇基對金奈米粒子之固定化，形成鍵結有DNA之金奈米粒子（相當於圖1中之金奈米粒子6）。接著將含有該金奈

米粒子之溶液在 90℃ 加熱 5 小時，使雙鏈解離（相當於圖 1 中之金奈米粒子 7）。

另一方面，將預先以前述記載方法分別獨立準備之吸附有 DNA9 及 10 之金奈米粒子（相當於圖 1 中金奈米粒子 8 及金奈米粒子 9）添加於上述含有金奈米粒子之溶液中，獲得金奈米粒子集合體（相當於圖 1 中金奈米粒子集合體 10）。

所得金奈米粒子集合體之透射型電子顯微鏡像示於圖 14。如圖 14 所示，獲得以非直線狀結合 3 個粒子之集合體。

[ 例 7 核酸 ( DNA ) 之調製 ]

[ 表 1 ]

表 1 使用之 DNA

DNA11	DNA12
Mw : 4,458 [ g/mol ]	Mw : 4,689 [ g/mol ]
鹼基數 : 15mer	鹼基數 : 15mer
鹼基序列 : TACGCCACCAGCTCC	鹼基序列 : GGAGCTGGTGGCGTA
OD (光學濃度) : 5.5	OD (光學濃度) : 5.5

<DNA 之調製及純化>

首先，準備處於互補鏈關係之單股 DNA11 及 DNA12（參考表 1）。

接著，於該等 DNA11 及 DNA12 中，將作為固定於金表面上之部位的硫醇基透過碳原子數 6 之直鏈烷基（C<sub>6</sub>）結

合至 5' 末端。

接著，於合成之硫醇基末端之 DNA11（或 DNA12）中，以對於 DNA 成爲 200 倍量之方式添加 DTT（二硫蘇糖醇），進而以 TE 溶液（Tris-EDTA 緩衝液：10mM 三羥甲基胺基甲烷，1mM EDTA，pH~8）溶解。以移液管移液、以渦流攪拌溶液後，於常溫反應 2 小時。藉由此操作，切斷 SH 化 DNA 之一部分爲 S-S 鍵之部分。

隨後，於經 DTT 處理之上述 DNA 溶液中，以相對於經 DTT 處理之 DNA 溶液成爲 1/10 倍量之方式添加 3M 乙酸鈉水溶液。進而以相對於 DNA 溶液成爲 2.5 倍量之方式，添加預先冷卻至 4℃ 之冷乙醇。隨後，於 -20℃ 冷凍櫃中靜置 6 小時以上，使 DNA 沉澱。所沉澱之 DNA 利用離心分離（4℃，12,000rpm；7,740G，30 分鐘）回收。利用該等乙醇沉澱-離心分離之純化，亦即添加 3M 乙酸鈉水溶液後至沉澱純化之循環再進行兩次。

〔例 8 硫醇基末端 DNA 對金奈米粒子之固定〕

於金奈米粒子分散液（BBInternational 製造；粒徑：10nm）1mL 中，添加 5nM 之於例 7 使 S-S 鍵還原（切斷）、純化之硫醇基末端 DNA（DNA11 或 DNA12），經移液管移液、以渦流攪拌 1 分鐘後，在 50℃ 靜置 12 小時，而促進 DNA 對金奈米粒子表面之固定化。

靜置 12 小時後，利用 UV 測定，確認金奈米粒子之分散、凝集狀態。圖 15 中顯示吸附硫醇基末端 DNA11 之金奈

米粒子分散液之紫外線·可見光吸收光譜測定結果。

於各金奈米粒子分散液中，添加  $40\mu\text{L}$  之  $2.5\text{M NaCl}$ 、 $20\mu\text{L}$  之  $500\text{mM}$  磷酸緩衝液 (pH7)，進而在  $50^\circ\text{C}$  靜置 40 小時。藉由此操作， $\text{NaCl}$  奪走金表面之負電荷 ( - )，在溶液中以未吸附於金奈米粒子表面之狀態而殘存之硫醇基末端 DNA 再度吸附於金奈米粒子表面。

靜置 40 小時後，利用 UV 測定，確認金奈米粒子之分散、凝集狀態。圖 16 中顯示吸附有硫醇基末端 DNA11 (圖 16 中，符號 17) 及硫醇基末端 DNA12 (圖 16 中，符號 18) 之金奈米粒子分散液之紫外線·可見光吸收光譜。

#### [ 例 9 金奈米粒子集合體之製作 ]

利用上述方法而分別固定有彼此互補鏈之 DNA (DNA11、DNA12) 之 2 種金奈米粒子溶液，以  $13,000\text{rpm}$  進行 30 分鐘離心，使金奈米粒子沉澱，去除上澄液。於其中添加  $10\text{mM}$  磷酸緩衝液 (含有  $0.1\text{M NaCl}$ ，pH7)  $0.5\text{mL}$  使沉澱物再分散。再度以  $13,000\text{rpm}$  進行 30 分鐘離心，去除上澄液後，再分散於  $1\mu\text{L}$  之  $0.01\%$  Tween-20、 $0.25\text{mL}$  之  $10\text{mM}$  磷酸緩衝液 (含有  $0.1\text{M NaCl}$ ，pH7) 中。

使用 DNA11 調製之金奈米粒子分散液稱為樣品 [ 1 ] 溶液，使用 DNA12 調製之金奈米粒子分散液稱為樣品 [ 2 ] 溶液。各樣品溶液以透射型電子顯微鏡觀察結果分別示於圖 17 及圖 18。

摻合如此所得之於表面結合有 DNA 之 2 種金奈米粒子

分散溶液，使DNA之互補鏈融合，藉此形成金奈米粒子間之結合，製造金奈米粒子集合體。

亦即，首先於1.5mL微量管中，添加1% Tween-20 1 $\mu$ L、樣品〔1〕溶液10 $\mu$ L、樣品〔2〕溶液10 $\mu$ L、5M NaCl 4 $\mu$ L，在75 $^{\circ}$ C之高溫槽中放置1小時後，在室溫靜置10分鐘。

10分鐘靜置後，確認溶液顏色由紅色變化成紫色，進而靜置20分鐘後，進行輕微離心分離，使所得集合體沉澱。

所得金奈米粒子集合體之透射型電子顯微鏡（TEM）像示於圖19。

〔例10 由鹼基數不同之DNA對金粒子表面之修飾〕

<DNA調製>

分別針對下述表2所示之3種DNA（DNA13~DNA15）進行如下處理。

於硫醇基末端DNA（DNA13~DNA15）中，以相對於DNA成爲200倍量之方式添加DTT（二硫蘇糖醇），接著以TE溶液（Tris-EDTA緩衝液：10mM三羥甲基胺基甲烷，1mM EDTA，pH~8）溶解。以移液管移液、以渦流攪拌溶液後，於常溫反應2小時。

隨後，於經DTT處理之上述DNA溶液中，以相對於經DTT處理之DNA溶液成爲1/10倍量之方式添加3M乙酸鈉水溶液。進而以相對於該DNA溶液成爲2.5倍量之方式，添加

預先冷卻至 4℃ 之冷乙醇。隨後，於 -20℃ 冷凍櫃中靜置 6 小時以上，使 DNA 沉澱。所沉澱之 DNA 利用離心分離（4℃，12,000rpm；7,740G，30分鐘）回收。利用該等乙醇沉澱-離心分離之純化，亦即添加 3M 乙酸鈉水溶液後至沉澱純化之循環再進行兩次。

[ 表 2 ]

表 2 實驗所使用之 3 種 DNA

名稱	DNA13	DNA14	DNA15
pmol	12,558	19,220	29,940
Mw[g/mol]	12,676	8,113	4,689
鹼基數[mer]	42	27	15
Tm	75.2	71.7	50.0
鹼基序列	XTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAC GCC ACC AGC TCC	XTT TTT TTT TTT TAC GCC ACC AGC TCC	GCC GCT GGT GGC GTA
OD	5.00	5.00	5.00

X : TAMRA-dt

< 硫醇基末端 DNA 對金奈米粒子之固定 >

於金奈米粒子分散液（BBInternational 製造；粒徑：10nm）1mL 中，添加 5nM 之在前述步驟純化之硫醇基末端 DNA（DNA13 至 DNA15），經移液管移液、以渦流攪拌 1 分鐘後，在 50℃ 靜置 24 小時，而促進 DNA 對金奈米粒子表面之固定化。

靜置 12 小時後，於各金奈米粒子分散液中，添加 40μL 之 2.5M NaCl、50μL 之 200mM 磷酸緩衝液（pH7），進而在

50℃ 靜置 45 小時。靜置後之各吸附有硫醇基末端 DNA 之金奈米粒子分散液（圖中，DNA13：符號 19，DNA14：符號 20，DNA15：符號 21）之紫外線·可見光吸收光譜測定結果示於圖 20。

分別固定有上述 3 種 DNA（DNA13~DNA15）之 3 種金奈米粒子溶液，隨後，以 14,000rpm（18,700G）進行 30 分鐘離心，使金奈米粒子沉澱，去除上澄液。於其中添加 10mM 磷酸緩衝液（含有 0.1M NaCl，pH7）0.5mL 使沉澱物再分散。再度以 14,000rpm 進行 30 分鐘離心，去除上澄液後，再分散於 1 $\mu$ L 之 0.01% Tween-20、0.25mL 之 10mM 磷酸緩衝液（含有 0.1M NaCl，pH7）中。

使用 DNA13 調製之金奈米粒子稱為樣品〔3〕溶液，使用 DNA14 調製之金奈米粒子稱為樣品〔4〕溶液，以 DNA15 調製之金奈米粒子稱為樣品〔5〕溶液。各樣品溶液之紫外線·可見光吸收光譜測定結果示於圖 21（圖中，DNA13：符號 19，DNA14：符號 20，DNA15：符號 21）。

<金奈米粒子集合體之製作（1）：樣品〔3〕溶液與樣品〔5〕溶液>

於 1.5mL 微量管中，添加 1% Tween-20 1 $\mu$ L、樣品〔3〕溶液（DNA 鏈長：42mer）10 $\mu$ L、樣品〔5〕溶液（DNA 鏈長：15mer）10 $\mu$ L、5M NaCl 4 $\mu$ L，在 75℃ 之高溫槽中放置 1 小時後，在室溫靜置 10 分鐘。

10 分鐘靜置後，確認溶液顏色由紅色變化成紫色，進

而靜置 20 分鐘後，進行輕微離心分離，藉由 DNA 鹼基之互補鏈融合而形成金奈米粒子間之結合獲得金奈米粒子集合體。所得集合體沉澱稱為樣品〔6〕。

<金奈米粒子集合體之製作（2）：樣品〔4〕溶液與樣品〔5〕溶液>

於 1.5mL 微量管中，添加 1% Tween-20 1 $\mu$ L、樣品〔4〕溶液（DNA 鏈長：27mer）10 $\mu$ L、樣品〔5〕溶液（DNA 鏈長：15mer）10 $\mu$ L、5M NaCl 4 $\mu$ L，在 75 $^{\circ}$ C 之高溫槽中放置 1 小時後，在室溫靜置 10 分鐘。

10 分鐘靜置後，確認溶液顏色由紅色變化成紫色，進而靜置 20 分鐘後，進行輕微離心分離，藉由 DNA 鹼基之互補鏈融合而形成金奈米粒子間之結合獲得金奈米粒子集合體。所得集合體沉澱稱為樣品〔7〕。

所得樣品〔6〕及樣品〔7〕之外觀（照片）示於圖 22。

。

〔實施例 3 利用核酸之分子辨識〕

將以硫醇基修飾對於肺癌之核酸製劑之一的 Aptamer AS1411 的末端之分子（獲自 Tsukuba Oligo Service 股份有限公司），吸附於例 9 所製造之金奈米粒子集合體表面，將其作用於肺癌細胞（a549），比較作用前後之拉曼散射光譜。

詳言之，於依據例 9 製造之金奈米粒子集合體分散液



(分散於 10mM 磷酸緩衝液 (pH7.0) 中) 中，添加 5nM 之 Aptamer AS1411 溶液，在 40 °C 攪拌 24 小時。隨後以 14,000rpm (18,700G) 進行離心 30 分鐘，使粒子沉澱，去除上澄液。於其中添加 10mM 磷酸緩衝液 (含有 0.1M NaCl, pH7) 0.5mL 使沉澱物再分散。再度以 14,000rpm 進行 30 分鐘離心，去除上澄液後，再分散於 1 $\mu$ L 之 0.01% Tween-20、0.25mL 之 10mM 磷酸緩衝液 (含有 0.1M NaCl, pH7) 中。

如此獲得之吸附 AS1411 之金奈米粒子集合體 20 $\mu$ L 添加於預先以培養皿培養之肺癌細胞中，放置 48 小時而對癌細胞進行吸附。隨後以拉曼分光裝置測定癌細胞表面，比較吸附前之癌細胞表面與吸附後之癌細胞表面之拉曼散射光譜，吸附 AS1411 之金奈米粒子集合體之拉曼散射光譜示於圖 23，a549 癌細胞之拉曼散射光譜示於圖 24，且吸附有吸附 AS1411 之金奈米粒子集合體之 a549 癌細胞之拉曼散射光譜示於圖 25。

如圖 24~圖 25 所示，吸附 AS1411 之金奈米粒子集合體作用於癌細胞，而使拉曼散射光譜有較大變化，可確認使用例 9 製造之金奈米粒子集合體可辨識分子。

#### [ 實施例 4 利用核酸之分子辨識 ]

將以硫醇基修飾對於肺癌之核酸製劑之一的 Aptamer AS1411 的末端之分子 (獲自 Tsukuba Oligo Service 股份有限公司)，吸附於以實施例 3 所示方法製造之金奈米粒子

集合體表面，將其作用於肺癌細胞（a549），嘗試吸附位置之構圖（mapping）。

將所得之吸附 AS1411 之金奈米粒子集合體 20 $\mu$ L 添加於預先以培養皿培養之肺癌細胞中，放置 48 小時對癌細胞進行吸附。隨後以拉曼分光裝置測定癌細胞表面，進行有關吸附相關之拉曼光譜之測定，源自來自癌細胞之 DNA 之磷酸之構圖與金粒子吸附之構圖之顯微鏡照片進而予以重疊並進行比較之結果，確認癌細胞獲得辨識。

〔產業上之可能利用性〕

本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料可使用作為高感度分子辨識感測劑，可使用作為微量分子辨識亦即作為生體相關物質之感測中之適宜材料。

#### 【圖式簡單說明】

圖 1 為表示本發明之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造流程之圖。

圖 2 為顯示 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3' 表面修飾之金奈米粒子之透射型電子顯微鏡像的圖。

圖 3 為顯示 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' 表面修飾之金奈米粒子之透射型電子顯微鏡像的圖。

圖 4 為顯示 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3' 表面修飾之金奈米粒子與 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' 表面修飾之金奈米粒子混合後之粒子狀態的透射型電子顯微

鏡像的圖。

圖 5 顯示固定有 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' 之金奈米粒子之原子間顯微鏡像之圖。

圖 6 為顯示 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3' 表面修飾之金奈米粒子與 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' 表面修飾之金奈米粒子混合後之粒子的原子間顯微鏡像之圖。

圖 7 為顯示固定有 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' 之金奈米粒子之由近場顯微鏡 (Near Field Optical Microscope) 所得形狀及電場測定之圖。

圖 8 為顯示 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3' 表面修飾之金奈米粒子與 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' 表面修飾之金奈米粒子混合後之粒子之由近場顯微鏡所得形狀及電場測定之圖。

圖 9 為顯示 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3' 表面修飾之金奈米粒子與 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' 表面修飾之金奈米粒子混合後之粒子的共振拉曼散射測定結果之圖。

圖 10 為顯示 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3' 表面修飾之金奈米粒子與 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' 表面修飾之金奈米粒子混合後之粒子隨溫度變化引起之拉曼散射強度變化之說明圖。

圖 11 為顯示利用在表面導入生物素作為感測探針之 5'-HS-C<sub>6</sub>-GCCACCAGCTCC-C<sub>6</sub>-TAMRA-3' 表面修飾之金奈米

粒子與 5'-HS-C<sub>6</sub>-GGAGCTGGTGGC-3' 表面修飾之金奈米粒子辨識鏈黴親合素 (Streptavidin) 之圖。

圖 12 為顯示於實施例 1 所得之以特定間距離連結之金奈米粒子之透射型電子顯微鏡像之圖。

圖 13 為顯示使用以特定間距離連結之金奈米粒子對鏈黴親合素之分子辨識結果之圖。

圖 14 為顯示於實施例 2 所得之以特定間距離連結之金奈米粒子之透射型電子顯微鏡像之圖。

圖 15 為顯示於例 8 所得之吸附有硫醇基末端 DNA11 之金奈米粒子分散液之紫外線·可見光吸收光譜之測定結果圖。

圖 16 為顯示於例 8 所得之進而吸附有硫醇基末端 DNA11 或硫醇基末端 DNA12 之金奈米粒子分散液之紫外線·可見光吸收光譜之測定結果圖 (DNA11: 符號 17, DNA12: 符號 18)。

圖 17 為顯示例 9 所得之樣品 [ 1 ] 溶液之透射型電子顯微鏡像之圖。

圖 18 為顯示例 9 所得之樣品 [ 2 ] 溶液之透射型電子顯微鏡像之圖。

圖 19 為顯示例 9 所得之金奈米粒集合體之透射型電子顯微鏡像之圖。

圖 20 為顯示於例 10 所得之吸附有硫醇基末端 DNA13、硫醇基末端 DNA14 或硫醇基末端 DNA15 之金奈米粒子分散液之紫外線·可見光吸收光譜之測定結果圖 (DNA13: 符

號 19，DNA14：符號 20，DNA15：符號 21）。

圖 21 為顯示於例 10 所得之樣品〔3〕溶液（DNA13）、樣品〔4〕溶液（DNA14）或樣品〔5〕溶液（DNA15）之金奈米粒子分散液之紫外線·可見光吸收光譜之測定結果圖（DNA13：符號 19，DNA14：符號 20，DNA15：符號 21）。

圖 22 為顯示例 10 所得之樣品〔6〕與樣品〔7〕之外觀（照片）之圖。

圖 23 為顯示 AS1411 吸附-金奈米粒子集合體之共振拉曼散射測定結果之圖。

圖 24 為顯示 a549 癌細胞之共振拉曼散射測定結果之圖。

圖 25 為顯示吸附有 AS1411 吸附-金奈米粒子集合體之 a549 癌細胞之共振拉曼散射測定結果之圖。

圖 26 為顯示源自來自癌細胞之 DNA 之磷酸的構圖（mapping）及金粒子吸附部位之構圖及癌細胞之顯微鏡照片之圖。

**【主要元件符號說明】**

1：硫醇末端單鏈 DNA1

2：處於與 DNA1 互補鏈之關係之單鏈 DNA2

3：中央部為雙鏈 DNA，於其兩端配置以 1 及 2 表示之單鏈 DNA 之 DNA3

4：於 DNA3 之兩端融合有 DNA1 及 DNA2 之 DNA4

- 5：金奈米粒子
- 6：於表面介隔硫醇基結合有DNA4之金奈米粒子
- 7：利用加溫使雙鏈解離並分離後之金奈米粒子
- 8：吸附有單鏈DNA1之金奈米粒子
- 9：吸附有互補鏈DNA2之金奈米粒子
- 10：金奈米粒子集合體
- 11：鍵結有單股DNA ( b ) 之金奈米粒子之位置資訊
- 12：自鍵結有單股DNA ( b ) 之金奈米粒子發出之電場資訊
- 13：金奈米粒子集合體中之金奈米粒子位置資訊
- 14：自金奈米粒子集合體中之金奈米粒子發出之電場資訊
- 15：由處於金奈米粒子集合體之接近狀態之金奈米粒子所增強之拉曼散射
- 16：由利用加溫而使金奈米粒子集合體消解之金奈米粒子所增強之拉曼散射
- 17：吸附有硫醇末端DNA11之金奈米粒子分散液之紫外線、可見光吸收光譜
- 18：吸附有硫醇末端DNA12之金奈米粒子分散液之紫外線、可見光吸收光譜
- 19：吸附有硫醇末端DNA13之金奈米粒子分散液之紫外線、可見光吸收光譜
- 20：吸附有硫醇末端DNA14之金奈米粒子分散液之紫外線、可見光吸收光譜

21：吸附有硫醇末端 DNA15 之金奈米粒子分散液之紫外線、可見光吸收光譜

# 發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100120882

G01N 21/65 (2006.01)

B22F 1/00 (2006.01)

※申請日：100年06月15日

※IPC分類：B82B 1/00 (2006.01)

B82B 3/00 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

表面增強拉曼散射用金屬粒子及分子感測

Metal particle for surface enhanced raman scattering and molecular sensing

## 二、中文發明摘要：

本發明提供一種增強拉曼散射用金屬奈米粒子，尤其是藉由粒子間距離之控制而控制其增強電場強度，且藉由賦予非常強的拉曼散射特性而提供高感度拉曼散射感測。

本發明提供一種分子感測用金屬奈米粒子材料，其係具備金屬奈米粒子集合體，該金屬奈米集合體係透過有機分子而連結金屬奈米粒子，藉以使3至10個金屬奈米粒子以各相鄰金屬奈米粒子間以特定距離結合而成者，且該集合體係於對其施加之電場內包含拉曼活性分子，而於增強電場中發出來自拉曼分子之經增強的拉曼散射光者；本發明亦提供該分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法及使用該分子感測用金屬奈米粒子材料之分子感測。



三、英文發明摘要：

**七、申請專利範圍：**

1. 一種分子感測用金屬奈米粒子材料，其係具備金屬奈米粒子集合體，該金屬奈米集合體係經藉由有機分子而連結金屬奈米粒子，而使3至10個金屬奈米粒子以各相鄰金屬奈米粒子間以特定距離結合而成者，且該集合體係於對其施加之電場內使包含拉曼活性分子，而於增強電場中發出來自拉曼分子之經增強的拉曼散射光者。

2. 如申請專利範圍第1項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述金屬奈米粒子係由在紫外光區域至紅外光區域具有產生表面電漿子（plasmon）共振之共振波長的金屬元素所成。

3. 如申請專利範圍第1或2項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述金屬奈米粒子為具有1nm至100nm之平均粒徑之粒子。

4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述金屬奈米粒子集合體中，所連結之金屬奈米粒子與其兩相鄰金屬奈米粒子間並非結合於一直線上。

5. 如申請專利範圍第1至4項中任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述有機分子於末端具有硫醇基或胺基，且包含核酸、聚乙二醇或碳氫化物。

6. 如申請專利範圍第5項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述有機分子為具有3至40之鹼基數，且於末端具有硫醇基或胺基之核酸。

7. 如申請專利範圍第6項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述核酸為DNA。

8. 如申請專利範圍第1至7項中任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其係由前述拉曼活性分子結合於前述有機分子上而成。

9. 如申請專利範圍第1至8項中任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其係由前述金屬奈米粒子於其金屬奈米粒子表面結合有至少一個以上之分子辨識探針分子而成。

10. 如申請專利範圍第1至9項中任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料，其中前述分子辨識探針分子為於末端具有硫醇基或胺基，且透過核酸、聚乙二醇或碳氫化物而結合分子辨識探針之分子。

11. 一種如申請專利範圍第1至10項中任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其包含下列步驟：

a) 於成為基體之單鏈核酸鏈(1)上，至少融合兩條與該核酸鏈(1)中之部分鹼基構造具有互補性且於一末端具有硫醇基之單鏈核酸鏈(2)而獲得形成雙螺旋之變性核酸鏈之步驟；

b) 使前述變性核酸鏈之硫醇基與金屬奈米粒子反應，於該金屬奈米粒子表面上結合變性核酸鏈後，於60~100°C加熱使變性核酸鏈之雙螺旋構造解離因而去除單鏈核酸鏈(1)，獲得透過硫醇基結合有單鏈核酸鏈(2)之金屬奈米粒子(1)之步驟；

c) 使與前述核酸鏈(2)具有互補性、且於一末端具有硫醇基之鹼基鏈長相等之單鏈核酸鏈(3)與金屬奈米粒子反應，獲得透過硫醇基結合有單鏈核酸鏈(3)之金屬奈米粒子(2)之步驟；

d) 使結合有單鏈核酸鏈(2)之金屬奈米粒子(1)與結合有單鏈核酸鏈(3)之金屬奈米粒子(2)混合，而製造使單鏈核酸鏈(2)與單鏈核酸鏈(3)融合形成雙螺旋之金屬奈米粒子集合體之步驟；

進而包含於前述a)步驟中使用之單鏈核酸鏈(2)或前述c)步驟中使用之單鏈核酸鏈(3)或其兩者上結合拉曼活性分子之步驟。

12. 一種如申請專利範圍第1至10項中任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其包含下列步驟：

a) 於成爲基體之單鏈DNA鏈(1)上，至少融合兩條與該DNA鏈(1)中之部分鹼基構造具有互補性且於一末端具有硫醇基之單鏈DNA鏈(2)而獲得形成雙螺旋之變性DNA鏈之步驟；

b) 使前述變性DNA鏈之硫醇基與金屬奈米粒子反應，於該金屬奈米粒子表面上結合變性DNA鏈後，於60~100℃加熱使變性DNA鏈之雙螺旋構造解離因而去除單鏈DNA鏈(1)，獲得透過硫醇基結合有單鏈DNA鏈(2)之金屬奈米粒子(1)之步驟；

c) 使與前述DNA鏈(2)具有互補性、且於一末端具有硫醇基之鹼基鏈長相等之單鏈DNA鏈(3)與金屬奈米

粒子反應，獲得透過硫醇基結合有單鏈 DNA 鏈（3）之金屬奈米粒子（2）之步驟；

d) 使結合有單鏈 DNA 鏈（2）之金屬奈米粒子（1）與結合有單鏈 DNA 鏈（3）之金屬奈米粒子（2）混合，而製造使單鏈 DNA 鏈（2）與單鏈 DNA 鏈（3）融合形成雙螺旋之金屬奈米粒子集合體之步驟；

進而包含於前述 a) 步驟中使用之單鏈 DNA 鏈（2）或前述 c) 步驟中使用之單鏈 DNA 鏈（3）或其兩者上結合拉曼活性分子之步驟。

13. 如申請專利範圍第 12 項之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其中前述步驟 d) 中，相對於該鏈結有單鏈 DNA 鏈（2）之金屬奈米粒子（1）之 1 當量，使用 2 當量之該鏈結有單鏈 DNA 鏈（3）之金屬奈米粒子（2）而製造金屬奈米粒子集合體。

14. 如申請專利範圍第 12 或 13 項之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其中前述單鏈 DNA 鏈（2）係不帶有具有相互互補性之部位者。

15. 如申請專利範圍第 12 至 14 項中任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料之製造方法，其中於 a) 至 d) 中之任一步驟中，進而包含下述步驟：

e) 使於包含核酸、聚乙二醇或碳氫化物之分子鏈一末端具有分子辨識探針且於另一末端具有硫醇基或胺基之分子辨識探針分子與金屬奈米粒子反應，而於金屬奈米粒子表面上透過硫醇基或胺基於末端結合分子辨識探針分子

之步驟。

16. 一種分子感測方法，其特徵為使如申請專利範圍第1至10項中任一項之分子感測用金屬奈米粒子材料與檢體接觸後，進行檢體之拉曼散射測定。

17. 如申請專利範圍第16項之分子感測方法，其係由前述分子感測用金屬奈米粒子材料固定於基板上而成。

圖 1

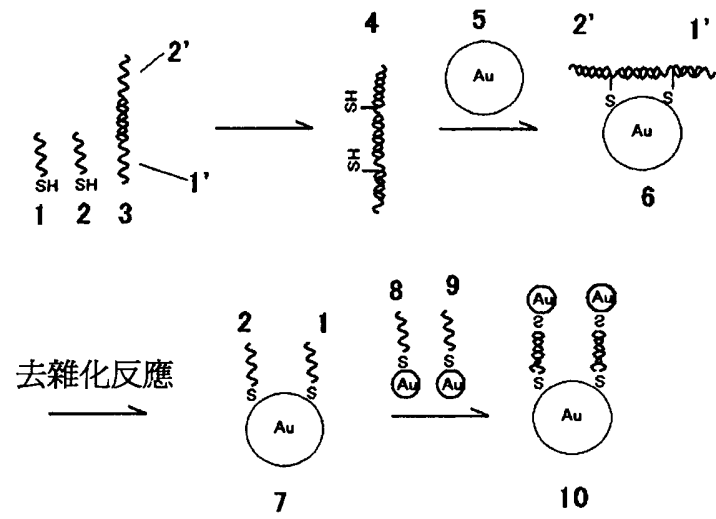


圖 2

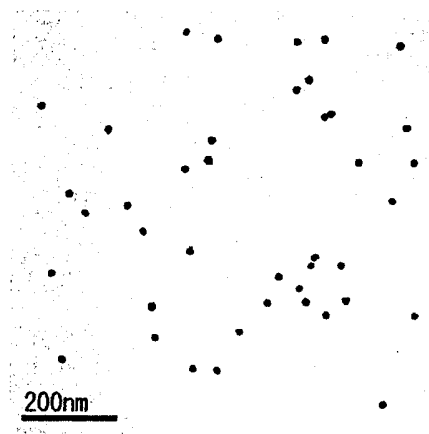


圖3

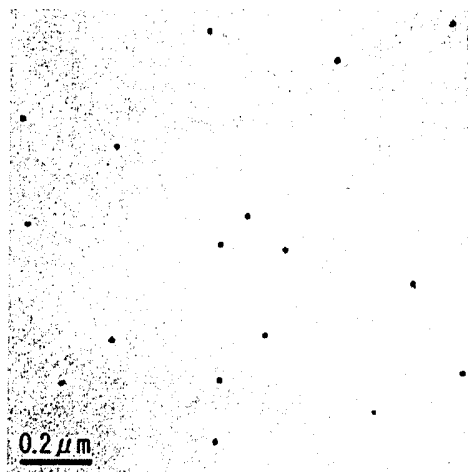


圖4

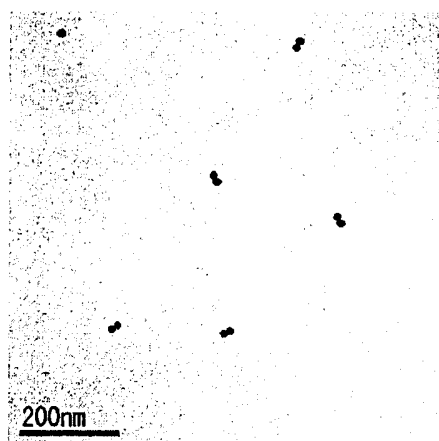




圖5

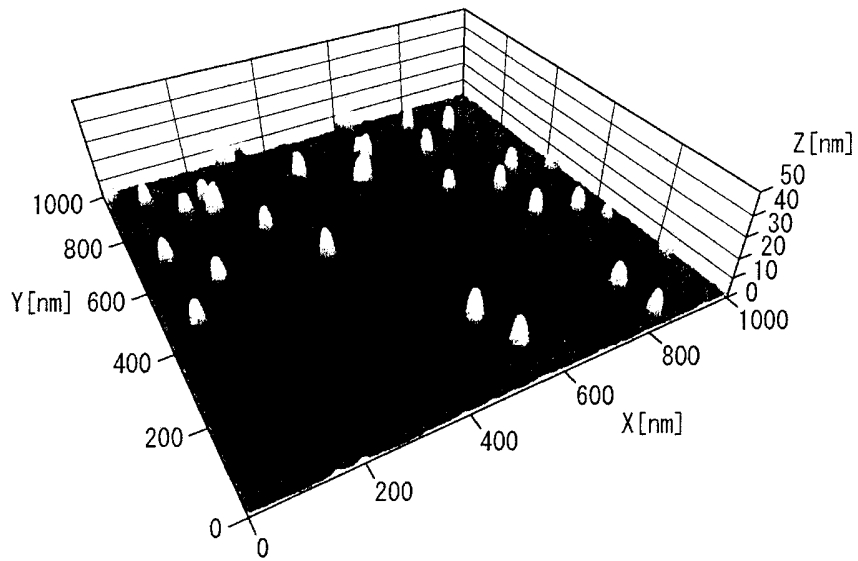


圖6

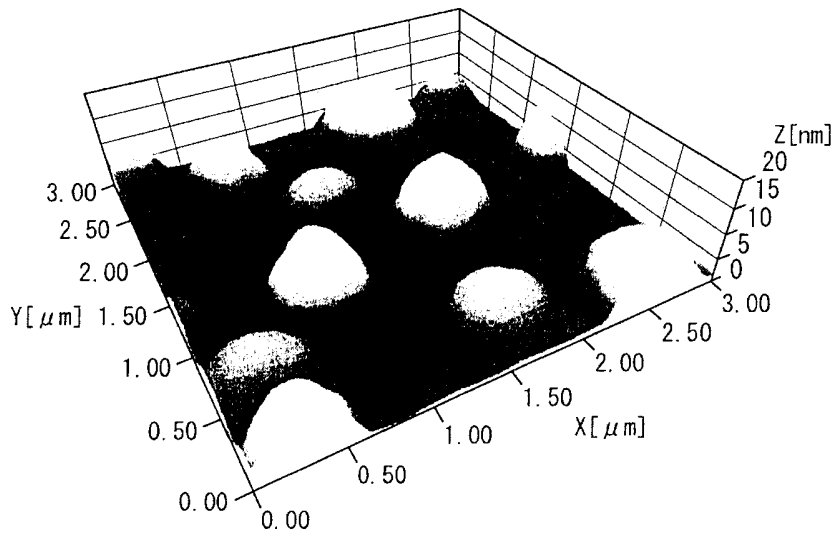


圖 7

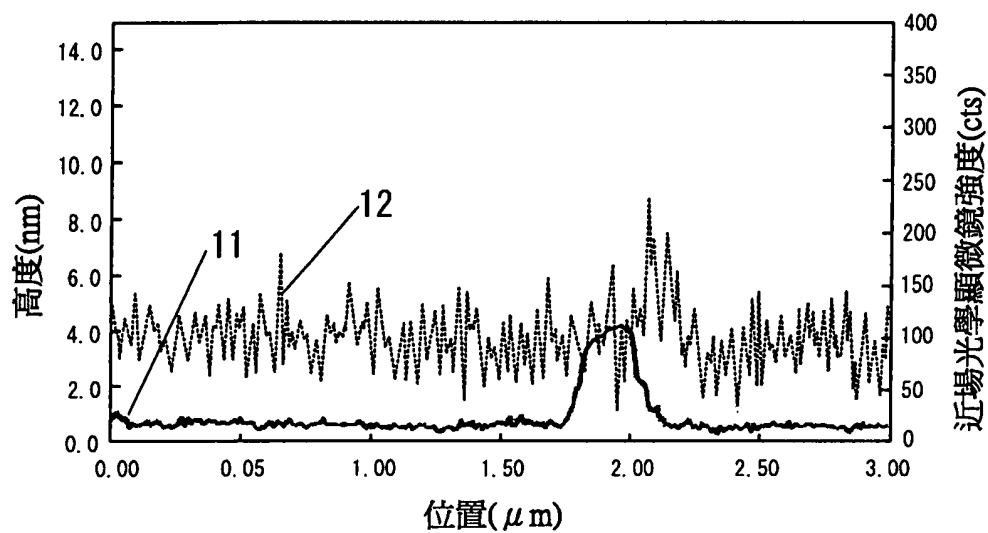


圖 8

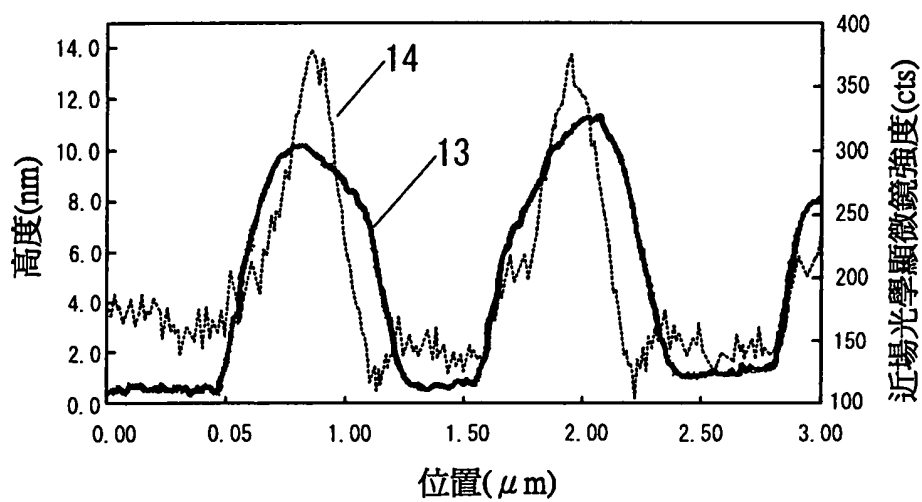


圖 9

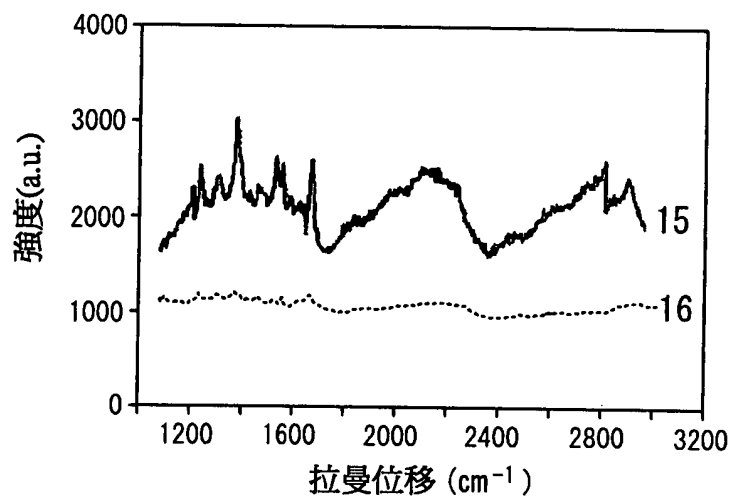


圖 10

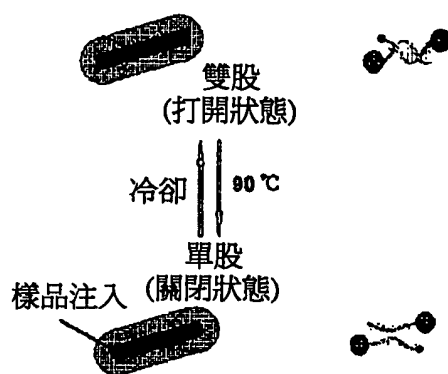


圖 11

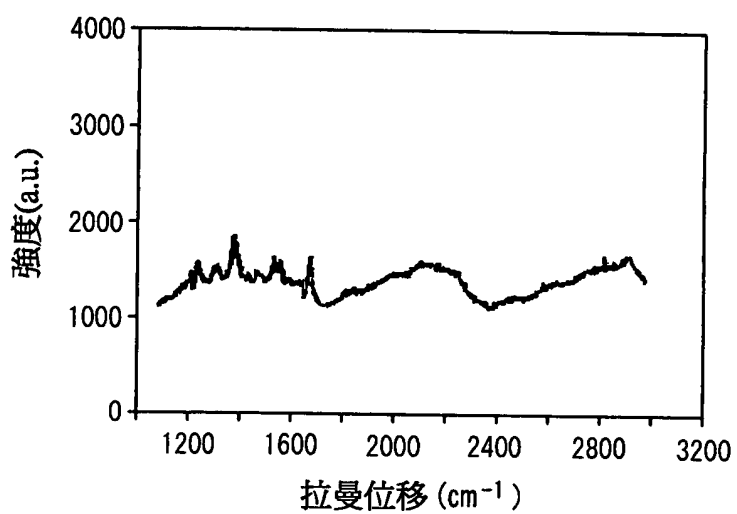


圖 12

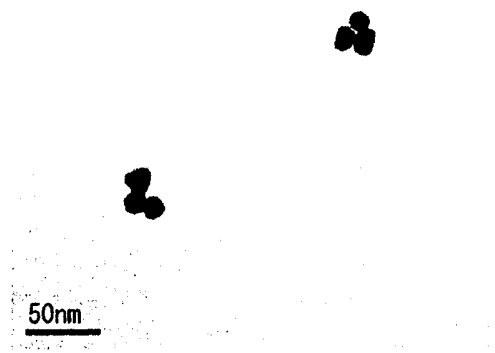


圖 13

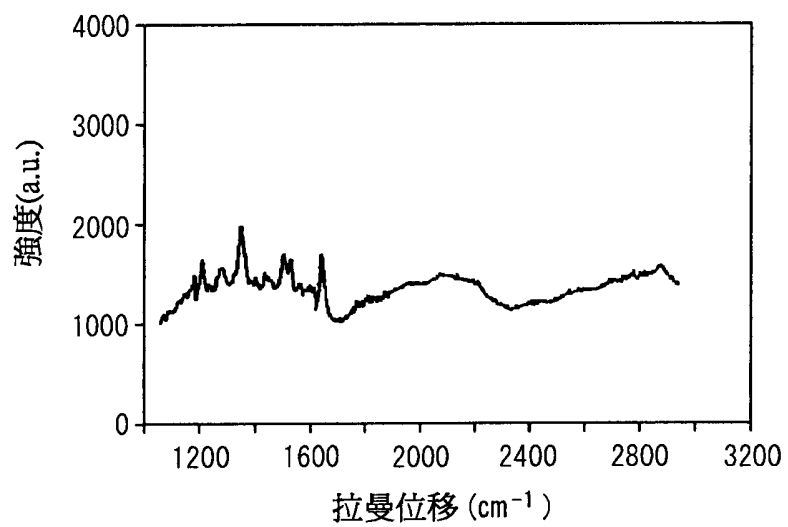


圖 14

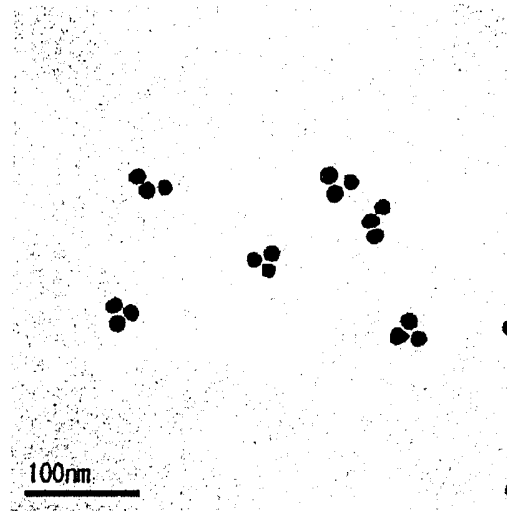


圖 15

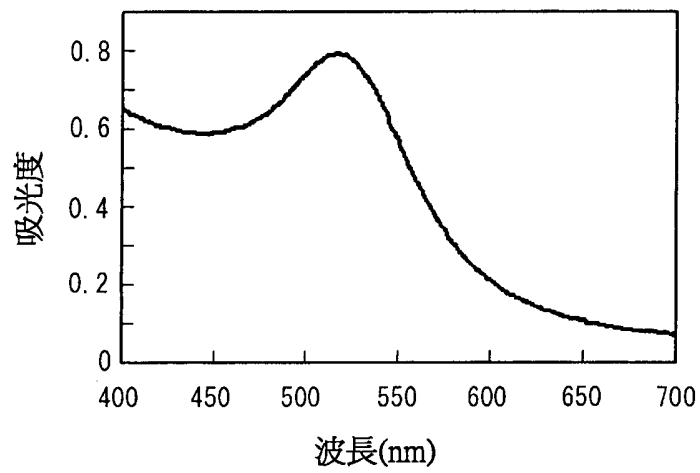


圖 16

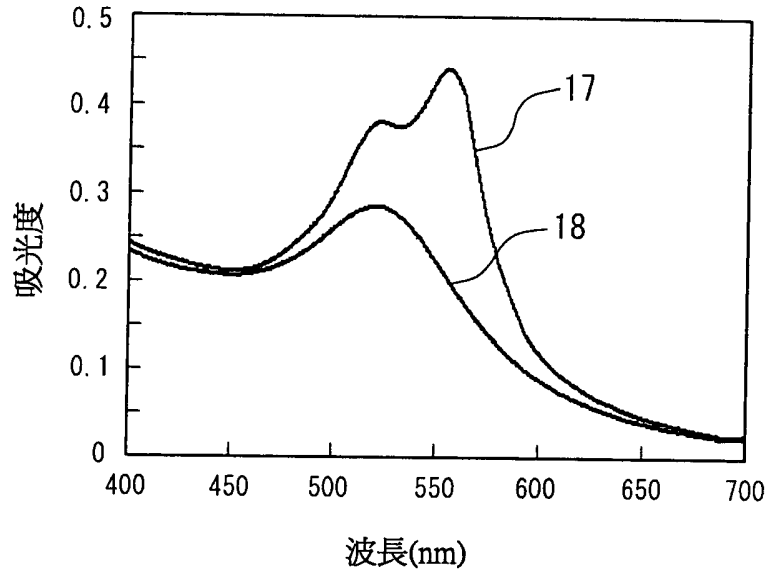


圖 17

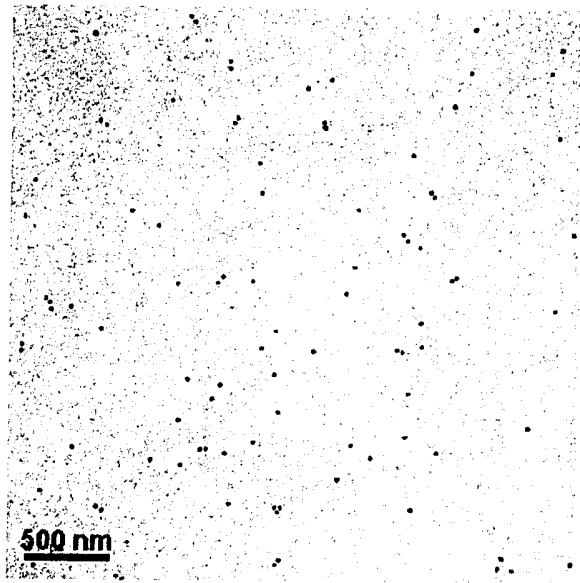


圖 18

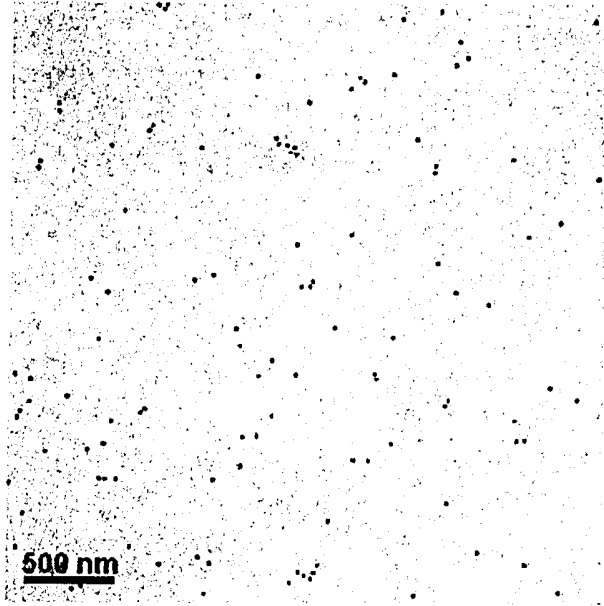


圖 19

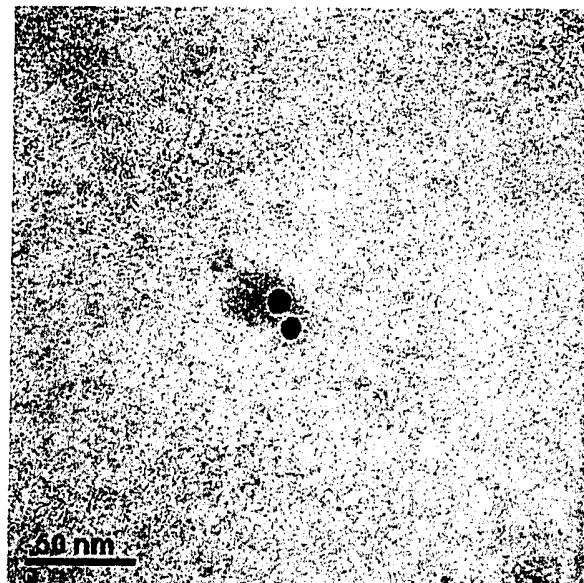


圖 20

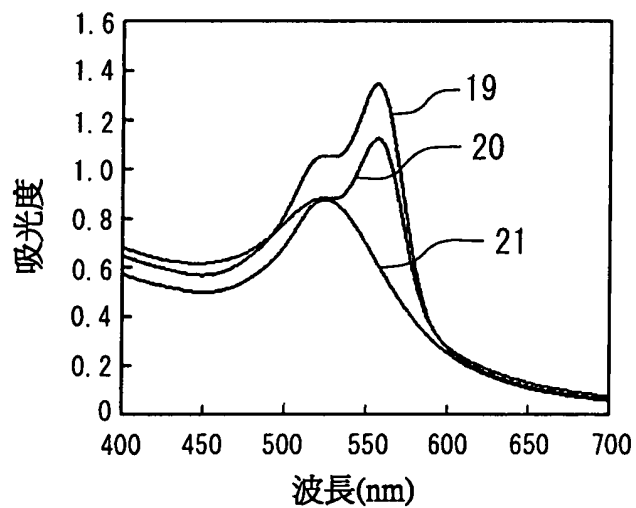


圖 21

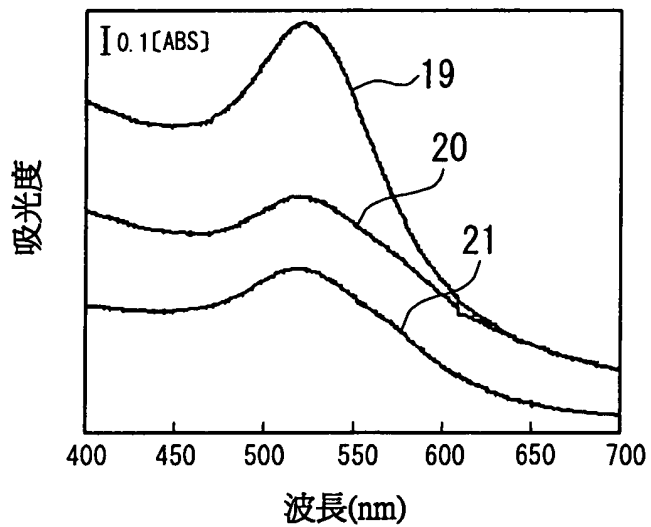




圖 22

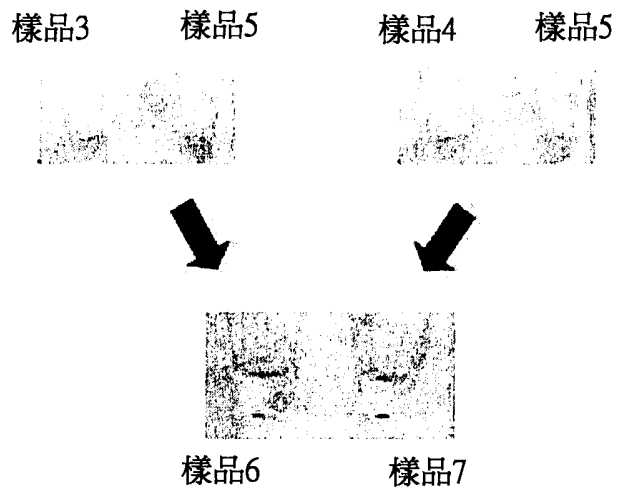


圖 23

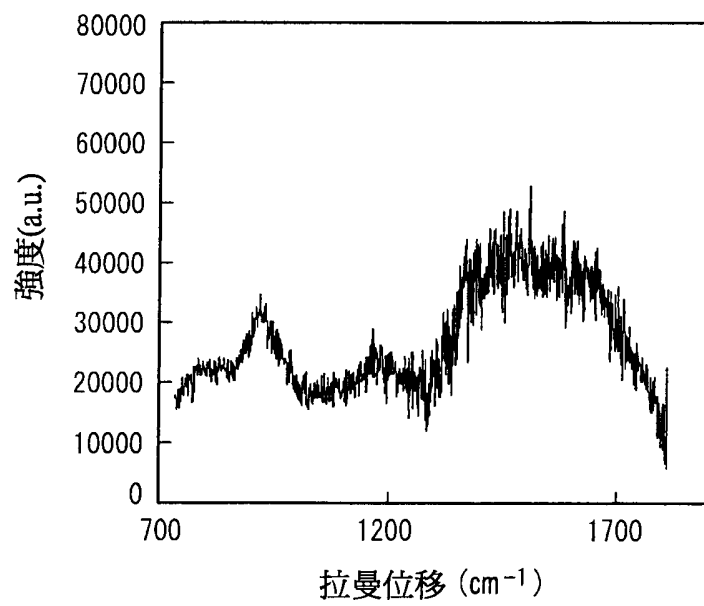


圖 24

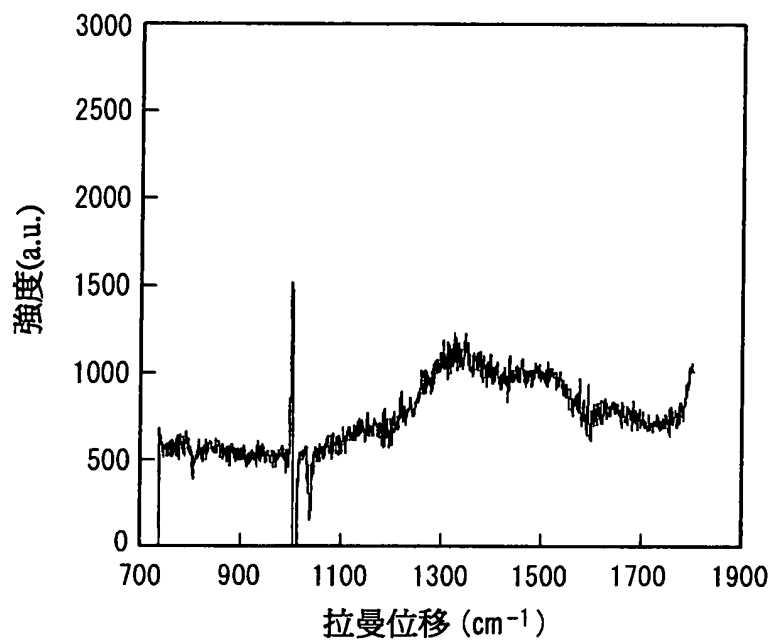
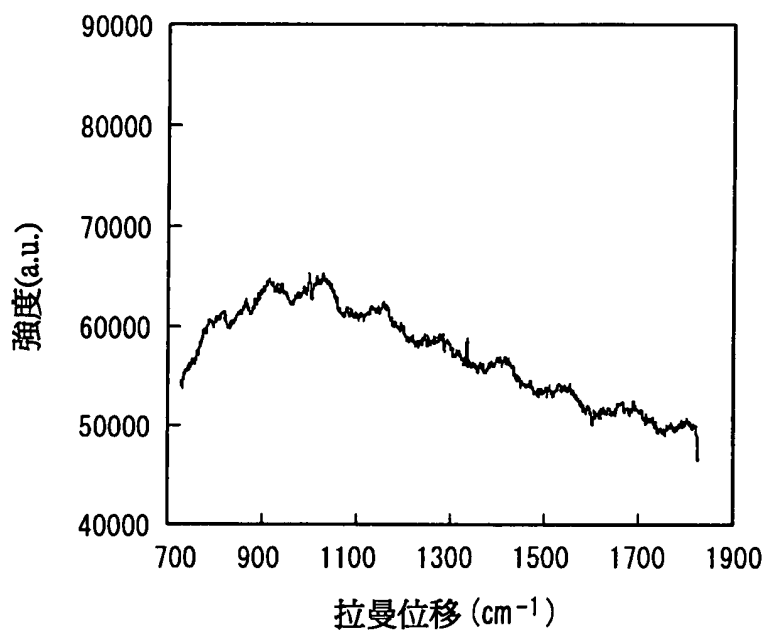
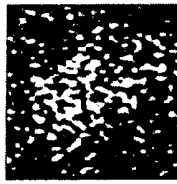


圖 25

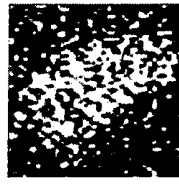


# 圖 26

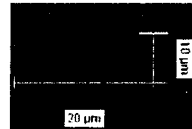
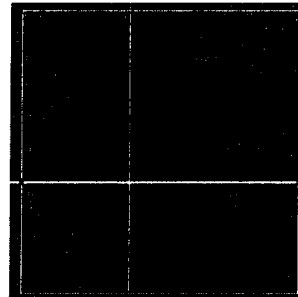
源自癌細胞(a549)  
DNA之磷酸



樣品6辨識  
部位構圖



癌細胞(a549)  
顯微鏡照片



四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

- 1：硫醇末端單鏈DNA1
- 2：處於與DNA1互補鏈之關係之單鏈DNA2
- 3：中央部為雙鏈DNA，於其兩端配置以1及2表示之單鏈DNA之DNA3
- 4：於DNA3之兩端融合有DNA1及DNA2之DNA4
- 5：金奈米粒子
- 6：於表面介隔硫醇基結合有DNA4之金奈米粒子
- 7：利用加溫使雙鏈解離並分離後之金奈米粒子
- 8：吸附有單鏈DNA1之金奈米粒子
- 9：吸附有互補鏈DNA2之金奈米粒子
- 10：金奈米粒子集合體

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