



(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 201804149 A

(43)公開日：中華民國 107 (2018) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：106120795

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 21 日

(51)Int. Cl. : G01N21/65 (2006.01)

(30)優先權：2016/06/21 日本

特願 2016-122885

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

(72)發明人：古性均 FURUSHO, HITOSHI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：5 項 圖式數：7 共 26 頁

(54)名稱

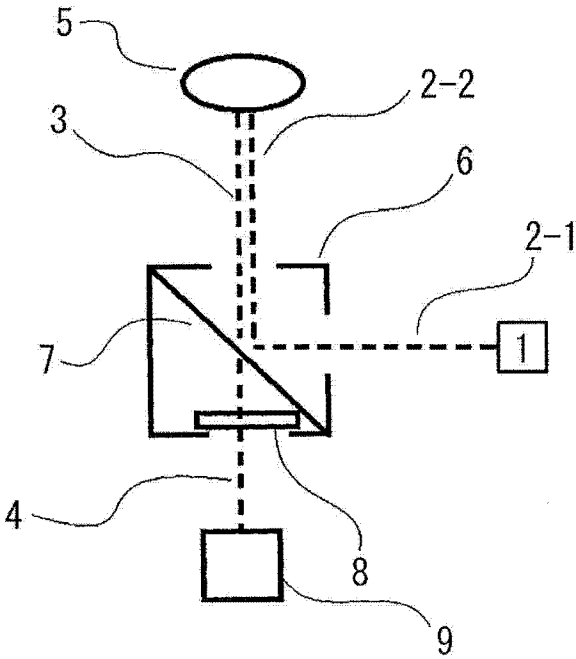
藉由拉曼散射之簡易感測法

SIMPLIFIED SENSING METHOD BY RAMAN SCATTERING

(57)摘要

本發明提供一種可應用先前之螢光顯微鏡中利用之反射鏡單元，以簡易之系統檢測目標波長之表面增強拉曼散射光之方法。本發明之檢測系統係使用使金屬奈米粒子與拉曼活性分子複合化之表面增強拉曼散射探針來檢測表面增強拉曼散射光之系統，且具備：光源，其發射激發光；第一光分割元件，其將自該光源以特定角度入射之激發光中之特定之波長域之光反射；試樣，其係含有表面增強拉曼散射探針者，藉由來自該第一光分割元件之反射光之照射而發射散射光；第二光分割元件，其係與上述第一光分割元件相同或不同之光分割元件，藉由該散射光之入射而使與上述特定之波長域不同之波長域之光透過；吸光濾光片，其被照射所透過之散射光，且使該散射光中之特定之波長域之拉曼散射光通過；及受光零件，其藉由通過該吸光濾光片後之拉曼散射光之入射而檢測增強拉曼散射。

指定代表圖：



【圖6】

符號簡單說明：

- 1 . . . 光源
- 2-1 . . . 激發光(入射光)
- 2-2 . . . 激發光(反射光)
- 3 . . . 散射光
- 4 . . . 拉曼散射光
- 5 . . . 試樣
- 6 . . . 濾光片稜鏡
- 7 . . . 光分割元件(分光鏡)
- 8 . . . 吸光濾光片
- 9 . . . 受光零件(CCD 相機)



201804149

申請日： 106/06/21

IPC分類： G01N 21/65 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】

藉由拉曼散射之簡易感測法

【英文發明名稱】

SIMPLIFIED SENSING METHOD BY RAMAN SCATTERING

【中文】

本發明提供一種可應用先前之螢光顯微鏡中利用之反射鏡單元，以簡易之系統檢測目標波長之表面增強拉曼散射光之方法。

本發明之檢測系統係使用使金屬奈米粒子與拉曼活性分子複合化之表面增強拉曼散射探針來檢測表面增強拉曼散射光之系統，且具備：光源，其發射激發光；第一光分割元件，其將自該光源以特定角度入射之激發光中之特定之波長域之光反射；試樣，其係含有表面增強拉曼散射探針者，藉由來自該第一光分割元件之反射光之照射而發射散射光；第二光分割元件，其係與上述第一光分割元件相同或不同之光分割元件，藉由該散射光之入射而使與上述特定之波長域不同之波長域之光透過；吸光濾光片，其被照射所透過之散射光，且使該散射光中之特定之波長域之拉曼散射光通過；及受光零件，其藉由通過該吸光濾光片後之拉曼散射光之入射而檢測增強拉曼散射。

【指定代表圖】

圖6

【代表圖之符號簡單說明】

- 1 光源
- 2-1 激發光(入射光)

- 2-2 激發光(反射光)
- 3 散射光
- 4 拉曼散射光
- 5 試樣
- 6 濾光片 稜鏡
- 7 光分割元件(分光鏡)
- 8 吸光濾光片
- 9 受光零件(CCD相機)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

藉由拉曼散射之簡易感測法

【英文發明名稱】

SIMPLIFIED SENSING METHOD BY RAMAN SCATTERING

【技術領域】

本發明係關於一種使用有表面增強拉曼散射光之分子感測方法。詳細而言，本發明提供一種不使用分光器而有效率地檢測來自測定對象表面之表面增強拉曼散射探針之表面增強拉曼散射的技術，尤其是關於一種對於活體組織等微量檢體之檢測有用之技術。

【先前技術】

作為對吸附於金屬表面之有機分子異常地發現之特性，有表面增強拉曼散射(Surface Enhanced Raman Scattering：SERS)。

該表面增強拉曼散射受到關注之一原因在於，自單一分子或單一粒子亦可獲得振動光譜。藉此能夠進行活體分子識別等微量化學物質之檢測，故當前正在熱烈展開各種研究(非專利文獻1、2、3)。

最初拉曼散射於其特性上係完全不適合此種微量檢測之物理現象。認為其原因如下。

拉曼散射起因於測定分子與自雷射光釋放之光子(photon)之碰撞。例如可估計於1秒鐘自波長488 nm氬雷射釋放之光子數於1 W輸出下為約 2.5×10^{18} 個。其中可與測定分子碰撞之光子為 $10^{13} \sim 10^{15}$ 個左右，大多數光子並未與該分子碰撞而是避開。於該略微與測定分子碰撞之光子之碰撞模式中，有彈性碰撞與非彈性碰撞之2種。前者於碰撞之期間並無分子與光子

間之能量之授受，故將於該碰撞模式下引起之散射稱為「瑞利散射」。由於瑞利散射中並無光子與分子間之能量授受，故散射光之振動數始終與入射光之波長相等。上述略微引起之分子與光子之碰撞之大部分為該彈性散射，即，散射光之大部分為瑞利散射。

另一方面，非彈性散射與彈性散射不同，光子在與分子碰撞時其能量移動至分子。因此與瑞利散射對照而言，散射光之振動數成為與入射光之振動數不同者。將此種散射稱為拉曼散射。尤其將拉曼散射光之振動數大於入射光之振動數之情形(光子自分子獲得能量之情形)稱為反斯托克斯拉曼散射(於較瑞利散射更短波長側檢測之散射)，相反地將拉曼散射光之振動數小於入射光之振動數之情形(光子對分子賦予能量之情形)稱為斯托克斯拉曼散射(於較瑞利散射更長波長側檢測之散射)。引起此種非彈性碰撞之光子為碰撞光子整體之約 $1/10^7$ 左右。即，與測定分子碰撞、且引起非彈性碰撞、引起拉曼散射之光子數相對於入射光子數非常少。因此拉曼散射光之檢測感度較低，目前為止被用作微量分析手段之情形較少。

然而，進入1970年代後開始報告由W. Holzer等人(非專利文獻4)進行之氣體鹵素分子之共鳴拉曼散射光譜之測定等許多與共鳴拉曼相關的研究。伴隨該共鳴拉曼散射之散射強度之增大(通常，由共鳴拉曼效應引起之強度增強為 $10^3 \sim 10^5$ 倍左右)，拉曼散射受到注目。所謂共鳴拉曼，於使用與某分子之吸收帶重疊之波長之激發光而測定拉曼散射時，由於來源於成為吸收帶之原因之發色團部分之振動的拉曼頻帶之強度顯著增大之效果，而能夠進行數 μM 左右之濃度之色素之拉曼光譜測定。

其後於1977年進而由P. P. Van Duyne等人(非專利文獻5)與J. A. Creighton等人(非專利文獻6)之組獨立地發現表面增強拉曼散射。實際

上，較之3年前便由Fleischmann等人之組觀測到此現象，但他們並未發覺散射剖面積與共鳴拉曼效應同樣地增大。

一般而言，表面增強拉曼散射(SERS，Surface-Enhanced Raman Scattering)係指金屬電極、溶膠、結晶、蒸鍍膜、半導體之表面上所吸附之某種分子之拉曼散射強度較該分子於溶液中時更顯著地增強之現象，但當前關於此種現象之機制有許多不明之處。於金、銀、銅、鉑、鎳等中確認表面增強拉曼散射，但當前瞭解之表面增強拉曼之特徵尤其是指於銀或金中增強效果較大。其代表物性顯示如下之依存性。

1)金屬表面之粗糙度與表面增強拉曼散射特性顯現具有某些關係。

2)表面增強拉曼散射光譜一般表示明確之波長依存性。

3)表面增強拉曼散射強度依存於吸附於金屬表面之分子之定向。

又，依存於自金屬表面起之距離。

表面增強拉曼散射特性顯現之機制當前提出2種觀點。其一為表面電漿子模式。該模式係被看作藉由激發光照射至金屬表面而產生反射光譜之表面電漿子之吸收，且認為其係藉由吸附分子之分子振動與該表面電漿子激發之耦合而顯現者。另一模式被稱為電荷移動模式，該觀點認為反射光譜係金屬表面與分子形成之錯合物之吸收，且藉由因該吸收所引起之共鳴拉曼效應而使表面增強拉曼散射顯現。

儘管當前其機制仍未闡明，但於表面增強拉曼散射之條件與先前所說明之共鳴拉曼條件重疊之表面增強拉曼散射中，散射強度增大至 $10^{11} \sim 10^{14}$ 倍左右變得明確，且單一分子分光之可能性較大地展現。因該感度之高低而於微量定性分析中已開始應用表面增強拉曼散射。

於藉由表面增強拉曼散射(SERS)之分子識別中，表面構建起到非常

重要之作用。

作為關於應用有表面增強拉曼散射之微量檢測或分子識別之技術，可舉出使顯現非常強之局域電場之金屬奈米粒子與光功能性分子複合化之奈米拉曼探針。關於此，有報告例如使低分子芳香環化合物直接藉由靜電相互作用而吸附於奈米粒子表面之方法、或使具有硫醇末端之若丹明、蔡、喹啉等報導分子吸附於奈米粒子表面者(非專利文獻7)等，且進行作為表面增強拉曼散射探針之對此種奈米粒子之分子識別感測器或pH感測器之應用(非專利文獻8)。

作為表面增強拉曼散射粒子之合成法，已知奈米薄片狀金屬複合體材料合成法(專利文獻1)、或使若丹明6G等色素(拉曼活性分子)吸附於奈米多孔質體表面之方法(專利文獻2)等，又，已知於應用金奈米粒子之例中將金奈米棒固定於基板上，且將其表面分子之增強拉曼散射用於分析(專利文獻3)等。

先前技術文獻

專利文獻

專利文獻1：日本專利特開2009-061580號公報

專利文獻2：日本專利特開2008-184671號公報

專利文獻3：日本專利特開2005-233637號公報

專利文獻4：日本專利第5835584號說明書

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. vol7, No9 2819-2823 (2007)

非專利文獻9：J. Am. Chem. Soc. Vol131, 7518-7519 (2009)

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

作為一般使用之分子識別法有免疫墨點(immunoblot)法。其係檢測特定蛋白質之方法，且係由經標記分子修飾後之特異抗體蛋白質而檢測轉錄(墨點化)至膜之特定蛋白質。具體而言，藉由電泳法將蛋白質分離，將其墨點化(轉錄)至膜片(膜)，進而以黏連劑塗佈該墨點化之膜片之表面，使識別目標蛋白質(抗原)之第一抗體作用於該膜片之後，使導入有表示分子識別能之標記(分子識別探針，例如螢光分子等)之第二抗體作用於該第一抗體，最終檢測(例如螢光檢測)標記，藉此檢測目標蛋白質。該方法一般被稱為西方墨點法。

然而，上述藉由西方墨點化法之分子識別存在如下問題，即，首先於藉由電泳法之蛋白質之分離中，於目標蛋白質與其他蛋白質接近或重疊之情形時，會引起誤識別等。

又指出，於使用螢光分子作為分子識別探針之情形時，於分子識別時形成螢光分子彼此特別集中於閉合場所之狀態，故於螢光分子之螢光發光時會引起能量移動，引起螢光強度減少等問題。尤其於活體分子識別中為避免由雷射光導致之檢體損傷，多使用紅色螢光發光劑，從而易引起此

類問題。

進而，於螢光檢測法中最成問題的是背景螢光(雜訊)。作為該原因之一可舉出檢體本身具有之螢光(自體螢光)，尤其於活體材料之情形時，牽涉到非常大的背景雜訊之情形並不少。因此於螢光探針非常微量之情形時(即目標物非常微量之情形時)，可產生分不清該背景螢光(雜訊)與來自螢光探針之螢光之情形。

另一方面，於使用拉曼散射之檢測中，一般會使用拉曼分光裝置。於本裝置(分光器)中，自樣本表面獲得之拉曼散射光藉由裝置內之繞射光柵(grating)而分光，且由CCD感測器(CCD(Charge Coupled Device，電荷耦合元件) sensor)檢測出分光後之各者之信號，故與螢光檢測相比所獲得之資訊量非常多。

例如於螢光檢測之情形時，所獲得之資訊受到螢光強度之限制，故於檢測中為瞭解其檢測物質之濃度之程度。又，尤其於活體物質之螢光檢測中，活體物質自身之螢光發光(自體螢光)可成為背景雜訊，故非常重要的是始終以信號/雜訊比(S/N比)變大之方式加以控制。

相對於此，於藉由拉曼散射光之檢測中，所獲得之資訊具有如下之優點，即，不僅可獲得取決於拉曼散射強度之檢測物質之濃度，而且可獲得由其分光光譜構成物質之結合資訊等。又，表面增強拉曼散射(SERS)之拉曼散射訊號遠大於通常之拉曼散射訊號，故S/N比非常大可謂為優點。

然而，先前之拉曼散射分光裝置非常昂貴，不適合簡易測定。

[解決問題之技術手段]

本發明者等人考慮基於上述課題而提供一種利用表面增強拉曼散射

具有之非常大的S/N比、且藉由更簡易之方法之物質檢測系統。而且發現，藉由應用先前之螢光顯微鏡中所利用之反射鏡單元，具體而言藉由使特定之波長域之光反射且使與其不同之波長域之光透過之光分割元件、與僅使特定之波長域之光通過之吸光濾光片加以組合而可以簡易之系統檢測目標波長之表面增強拉曼散射光的方法，從而完成本發明。

即，作為第1觀點，本發明係關於一種檢測系統，其係使用使金屬奈米粒子與拉曼活性分子複合化之表面增強拉曼散射探針來檢測表面增強拉曼散射光之系統，且具備：

光源，其發射激發光；

第一光分割元件，其將自該光源以特定角度入射之激發光中之特定之波長域之光反射；

試樣，其係含有表面增強拉曼散射探針者，藉由來自該第一光分割元件之反射光之照射而發射散射光；

第二光分割元件，其係與上述第一光分割元件相同或不同之光分割元件，藉由該散射光之入射而使與上述特定之波長域不同之波長域之光透過；

吸光濾光片，其被照射所透過之散射光，且使該散射光中之特定之波長域之拉曼散射光通過；及

受光零件，其藉由通過該吸光濾光片後之拉曼散射光之入射而檢測增強拉曼散射。

作為第2觀點，如第1觀點之檢測系統，其中上述第一光分割元件及第二光分割元件係相同之分光鏡，上述特定角度為 $45^{\circ} \pm 10^{\circ}$ 。

作為第3觀點，如第2觀點之檢測系統，其中上述分光鏡相對於上述

入射之激發光之光軸以 $45^{\circ}\pm 10^{\circ}$ 而配置，上述吸光濾光片進而具備落射螢光顯微鏡用濾光片稜鏡，其適合相對於上述透過之散射光之光軸以 $90^{\circ}\pm 20^{\circ}$ 而配置。

作為第4觀點，如第1觀點至第3觀點中何一項之檢測系統，其中上述光源係雷射。

作為第5觀點，如第1觀點至第3觀點中任一項之檢測系統，其中上述光源係氙弧燈、水銀燈或LED光源。

[發明之效果]

根據本發明，即便不使用拉曼分光裝置(分光器)，亦可用簡易之系統，例如利用先前螢光檢測中所使用之螢光顯微鏡之反射鏡單元而檢測來自固定於金屬奈米粒子之接近界面之有機分子(表面增強拉曼散射探針)之目標波長的表面增強拉曼散射光，藉此進行物質檢測。

尤其於先前之螢光檢測中，自檢體發出之檢體固有之螢光(自體螢光)始終作為背景雜訊而存在，故於微量檢測時，來自目標之分子識別探針(螢光分子)之螢光與該雜訊之分割變得困難，相對於此，拉曼散射光為拉曼探針特有之光譜，故可與檢體自身之散射光明確地區別。

又，原本檢體自身之拉曼散射光譜之強度非常小，另一方面，來自表面增強拉曼散射探針之表面增強拉曼散射(SERS)之強度非常大，故於使用有表面增強拉曼散射之檢測中與螢光檢測相比可確保較大之S/N比，從而能夠以上述簡易之系統進行高感度之檢測。

【圖式簡單說明】

圖1係表示將實施例1中製備之表面增強拉曼散射粒子(使金奈米粒子表面擔載孔雀綠之粒子)用作表面增強拉曼散射探針時所獲得之來自金表

面之表面增強拉曼位移(cm^{-1})的圖。

圖2係表示將實施例1中製備之表面增強拉曼散射粒子(使金奈米粒子表面擔載孔雀綠之粒子)用作表面增強拉曼散射探針時所獲得之來自金表面之表面增強拉曼波長(nm)的圖。

圖3係表示實施例1中製備之表面增強拉曼散射(SERS)粒子之表面增強拉曼散射波長、與各種吸光濾光片之透光波長之關係的圖(各濾光片之透過中心波長A：685 nm，B：690 nm，C：700 nm)。

圖4係表示用於實施例中使用之反射鏡單元之吸光濾光片之透光特性的圖(透過中心波長：685 nm)。

圖5係表示實施例中使用之分光鏡之透光特性之圖。

圖6係表示檢測本發明之表面增強拉曼散射光之系統之一例的圖。

圖7係表示來自實施例4中檢測之K562細胞表面之拉曼散射光之觀察照片的圖。

【實施方式】

如上所述，使用螢光分子作為分子識別探針之上述活體物質之檢測法(免疫墨點法)受到廣泛重視，但由於活體物質之自體發光會變成背景螢光(雜訊)，故於作為目標之檢測物為微量顯現之情形時，會發生難以提高S/N比之事態。

此處，本發明者等人著眼於表面增強拉曼散射之強度相對於通常之拉曼散射之強度飛躍性地提高。此前於拉曼散射之研究領域使用分光器之光譜分析為研究之中心，關於對單一波長檢測之應用並無報告。本發明者等人於進行上述微量之活體物質之檢測時，代替螢光檢測而開始致力於使用拉曼散射之特定波長之檢測，且藉由使用表面增強拉曼散射探針而實現

較大之S/N比，不使用先前之分光器，以簡易之系統，例如藉由應用先前之螢光顯微鏡之反射鏡單元便完成可簡易且高感度地檢測微量顯現之目標物之系統。

具體而言，發現著眼於自表面增強拉曼散射探針獲得之拉曼散射光譜之特定波長(nm)之散射光，將激發波長入射至樣本，且將僅使所著眼之特定波長(nm)之拉曼散射光透過之濾光片與分光鏡等光分割元件加以組合，藉此能夠檢測拉曼散射光。

以下，詳細敘述本發明。

<檢測表面增強拉曼散射光之系統>

本發明之檢測表面增強拉曼散射光之系統(以下，稱為「拉曼散射光檢測系統」)包含：

光源，其發射激發光；第一光分割元件，其將特定之波長域之光反射；試樣，其含有表面增強拉曼散射探針；第二光分割元件，其使與上述特定之波長域不同之波長域之光透過；吸光濾光片，其使特定之波長域之光通過；及受光零件，其檢測增強拉曼散射光。

以下，對本發明之各構成進行詳述。

1)發射激發光之光源

作為激發光源並未特別限定，但為了有效率地檢測來自測定對象(試樣)之拉曼散射光，較佳為使用雷射，可根據使用目標(測定對象)而使用各種雷射。又，作為光源，亦可使用氬弧燈、水銀燈、LED光源等。

再者，若來自測定對象之拉曼散射光與螢光重疊，則無法獲得良好之拉曼光譜，但拉曼散射光之波長依存於激發光之激發波長而變化，故較理想為考慮測定對象之拉曼散射特性及螢光特性進行選擇。

2)光分割元件

本發明中使用之光分割元件係將以特定角度入射之光中特定之波長域之光反射的元件，而且係使與上述特定之波長域不同之波長域之光透過的元件。

於本發明之拉曼散射光檢測系統中，第一光分割元件係將自上述光源以特定角度入射之激發光中特定之波長域(例如，自試樣產生所著眼之拉曼散射之波長域)之光朝下述試樣反射的元件，可謂承擔將反射光照射至該試樣之動作之元件。特定之波長域藉由用於試樣、例如表面增強拉曼散射探針之拉曼活性分子而決定。又，第二光分割元件係使來自下述試樣之散射光入射，且使與上述特定之波長域不同之波長域之光透過的元件，可謂承擔使來自試樣之散射光朝下述吸光濾光片通過之動作之元件。例如，第二光分割元件係實質上不使來自試樣之散射光中之瑞利散射光透過而使其他拉曼散射光等散射光透過之元件。

本發明之拉曼散射光檢測系統可包含將特定之波長域之光反射之第一光分割元件、及使與上述特定之波長域不同之波長之光透過之第二光分割元件之2個不同的光分割元件。又，根據照射至下述試樣之反射光(激發光)、或朝下述吸光濾光片通過之來自試樣之散射光之波長或光之強度等，第一光分割元件、以及第二光分割元件之任一者均亦可由2個以上之複數個光分割元件而構成。

或者，又於本發明之拉曼散射檢測系統中，可將第一光分割元件與第二光分割元件設為相同之元件。即，光分割元件承擔使激發光反射且使反射光照射至試樣之動作，並且亦可承擔使來自試樣之散射光朝吸光濾光片透過之動作。

於較佳之態樣中，較佳為上述第一光分割元件與第二光分割元件以相同之元件構成，且使用分光鏡作為此種光分割元件，又，亦可使用無波長選擇性之半反射鏡。

其中作為光分割元件，較佳為使用尤其使以 $45^{\circ}\pm 10^{\circ}$ 入射之光中之特定波長域之光反射、且使與其不同之波長域之光透過的分光鏡。

3)含有表面增強拉曼散射探針之試樣

於作為測定對象之試樣中，含有藉由來自第一光分割元件之反射光之照射而發射散射光之表面增強拉曼散射(SERS)探針。

使表面增強拉曼散射訊號顯現之表面增強拉曼散射(SERS)探針並未特別限定。例如可藉由以下方法而製作，即，使由下述之數奈米至數百奈米、例如40 nm左右之粒徑構成之金屬奈米粒子之表面吸附(未特別限定)色素分子作為拉曼活性分子，且使所獲得之奈米粒子進而凝集至不沈澱之程度(參照專利文獻4)。進而使該表面增強拉曼散射粒子吸附(未特別限定)例如識別細胞之核酸適體等可識別目標檢體之分子識別探針分子，藉此可形成表面增強拉曼散射之細胞識別粒子(SERS識別粒子)。使表面增強拉曼散射識別粒子作用於試樣，於識別檢體之後進行拉曼散射測定，藉此能夠進行目標檢體之檢測。

作為上述金屬奈米粒子並未特別限定，可舉出包含如下金屬元素之粒子，即，自紫外線區域至紅外線區域具有不產生表面電漿子共鳴之共鳴波長之金屬元素，例如選自金、銀、銅、鉑、鎳、鋁等之金屬元素，尤其以使用金奈米粒子或銀奈米粒子為佳，其中較佳為使用金奈米粒子。

上述金屬奈米粒子較理想為具有1 nm至500 nm之平均粒徑，較佳為具有1 nm至100 nm之平均粒徑，更佳為具有5 nm至100 nm之平均粒徑，

特佳為具有5 nm至50 nm之平均粒徑，例如具有20 nm左右、或40 nm左右之平均粒徑。

又，作為上述拉曼活性分子，可舉出例如選自若丹明6G(R6G)、結晶紫(CRV)、香豆素、孔雀綠、及各種食品著色料之色素分子，連結有若干芳香環之縮合環化合物等亦可用作拉曼活性分子。

如先前所述，若藉由拉曼分光裝置觀察上述表面增強拉曼散射識別粒子之拉曼散射光，則可獲得依存於拉曼探針之光譜。通常拉曼散射光之光譜係以波數(cm^{-1})表示。若將入射雷射光及散射光之波長分別設為 λ_i 、 $\lambda_s(\text{cm})$ ，則此處獲得之光譜(波數)以 $[\text{波數}(\text{cm}^{-1}) = 1/\lambda_i - 1/\lambda_s]$ 表示，故可使用該關係式將波數/波長相互轉換。繼而，選定著眼於基於表面增強拉曼散射識別粒子獲得之拉曼散射光譜之特定波長而使特定之波長域之光入射至試樣、繼而僅使所著眼之拉曼散射光透過的上述光分割元件及下述透光濾光片。

4)吸光濾光片

本發明中，作為吸光濾光片，只要選擇使透過上述第二光分割元件之散射光中之特定之波長域之拉曼散射光通過的濾光片即可。如上所述，拉曼散射光之波長依存於激發光之激發波長而變化，故只要考慮測定對象之拉曼散射特性而選擇吸光濾光片即可。例如，選擇可將所著眼之拉曼散射光朝下述受光零件透過之吸光濾光片。

5)受光零件

作為檢測增強拉曼散射之受光零件，並未特別限定，可使用CCD感測器等。

6)濾光片稜鏡

本發明之較佳之態樣中，可利用落射螢光顯微鏡用濾光片稜鏡。該濾光片稜鏡可將上述光分割元件(分光鏡)相對於入射光(激發光)之光軸以 $45^{\circ}\pm 10^{\circ}$ 而設置，且可將上述吸光濾光片相對於上述透過之散射光之光軸以 $90^{\circ}\pm 20^{\circ}$ 而設置。再者，通常於進行螢光檢測之情形時，於濾光片稜鏡中除吸光濾光片、光分割元件之外還設置激發濾光片，且包含該等而構成反射鏡單元，但於拉曼檢測之情形時，較多之情況下使用雷射作為激發光源，故用於選擇激發光之激發濾光片並非必須。再者，於使用上述之氬弧燈、水銀燈或LED光源作為光源之情形時，較佳為使用激發濾光片來選擇激發光。

如此，於本發明中，使用用於既存之螢光顯微鏡之器具、裝置，可容易地構建用於檢測目標波長之表面增強拉曼散射光之系統。

圖6中表示檢測本發明之表面增強拉曼散射光之系統之一例。於本例中，上述第一光分割元件(反射)與上述第二光分割元件(透過)使用相同之光分割元件7，將該光分割元件7與吸光濾光片8配置於濾光片稜鏡6，構成反射鏡單元。

如圖6所示，自光源1照射之激發光(入射光)2-1經光分割元件7反射，所反射之激發光(反射光)2-2照射試樣5(包含未圖示之表面增強拉曼散射探針)。繼而藉由激發光2-2之照射，自試樣5激發之散射光3透過光分割元件7及吸光濾光片8，作為目標之波長之拉曼散射光4由受光零件9、例如CCD相機等受光。

關於光分割元件7之選擇，例如於使用顯現斯托克斯拉曼散射之檢測探針之情形時，只要選擇使激發波長之光反射，且使較激發波長更長波長之光透過之分光鏡即可。具體而言，於使用下述實施例中所用之金奈米

粒子吸附作為拉曼活性分子之孔雀綠之探針之情形時，只要將530 nm雷射用作激發光，並使用使530 nm雷射光反射、且使較540 nm更長波長之光透過之鏡，則能夠將作為目標之683 nm拉曼光導入至受光零件(檢測器)。

又，於使用半反射鏡作為光分割元件之情形時，若使用由半反射鏡使80%之光反射、且20%之光透過之鏡，則可根據與上述相同之理由將拉曼散射光導入至檢測器。但是，該情形時要求非常強之拉曼散射強度。

透過光分割元件7之拉曼散射光例如圖2所示具有各種波長，故為了自其中提取特別關注之波長之光而應用僅透過特定之波長之吸光濾光片8。於下述實施例中，藉由使用例如僅透過685 nm附近之波長之光之吸光濾光片而可僅將該發光波長之拉曼散射光導入至受光零件9(檢測器)。

再者，若對金屬奈米粒子照射光等外部電場，則伴隨該電場振動，金屬表面之電子振動，且於粒子界面形成隨附於該振動之振動電場。例如若粒子接近，則該振動電場相加且形成增強電場。該增強電場之強度依存於接近之粒子之距離，粒子間隔越窄則越強，若於某距離取最大值，接近粒子接合，則因粒子形態變化而使電場強度產生偏頗。因此，重要的是首先於金屬粒子彼此未接合之狀態下形成可接近之場。

例如於本發明中，於下述實施例中，使用按照專利文獻4合成之表面增強拉曼散射粒子。關於表面增強拉曼散射粒子之合成並未特別限定，但於使用孔雀綠作為拉曼活性分子之情形時，自使用有孔雀綠之表面增強拉曼散射探針獲得之拉曼散射光如圖1所示。

使用上述關係式將該所獲得之拉曼散射光譜之橫軸之波數(cm^{-1})轉換為波長(nm)後為圖2。例如，於檢測圖2之683 nm光譜之情形時，對螢光

顯微鏡之螢光反射鏡單元並未特別限定，但若對吸光濾光片使用透過685 nm附近之波長之濾光片，則可使用先前之螢光顯微鏡把握自孔雀綠發出之拉曼散射光。

如上所述，本發明係於如先前之拉曼散射之檢測中不使用大規模之拉曼分光器而簡便地檢測拉曼散射光之非常有用的技術。

[實施例]

以下，使用實施例對本發明更具體且詳細地進行說明，但本發明並不限定於該等。

[實施例1 表面增強拉曼散射粒子分散液之合成]

對金奈米粒子分散液(Sigma-Aldrich公司製造，粒徑40 nm)190微升，混合予先調整成100微莫耳/升之DNA適體10微升，於室溫下攪拌17小時，其後於50℃下放置3小時，獲得適體吸附金粒子分散液。將調整成濃度1毫莫耳/升之孔雀綠溶液1微升添加至上述適體吸附金粒子分散液，攪拌1小時。於攪拌結束後，將該分散液以10,000轉/秒之速度離心10分鐘，使粒子沈澱，回收表面增強拉曼散射粒子。視需要利用水將粒子清洗數次。其後，使上述粒子分散至特定量之水或含有磷酸緩衝液或其他鹽之水中，形成表面增強拉曼散射粒子分散液。

[實施例2 表面增強拉曼散射光之測定]

將實施例1中所製作之表面增強拉曼散射粒子分散液注入至內徑500微米之石英毛細管，對其藉由(股)堀場製作所製造之拉曼分光器(530 nm雷射，20倍物鏡)而進行表面增強拉曼散射光譜測定。將所得之結果分別示於圖1(橫軸：拉曼位移)及圖2(橫軸：拉曼波長)。

[實施例3 導入至螢光濾光片單元之鏡及光學濾光片之選定]

圖3中表示實施例1中所製備之表面增強拉曼散射粒子之表面增強拉曼散射波長、與各種吸光濾光片之透光波長之關係。於圖3中，由A、B及C表示之波長範圍表示分別具有透過中心波長685 nm、690 nm、700 nm之吸光濾光片之各透光波長範圍。

又，圖4中表示透過中心波長：685 nm之吸光濾光片之透光特性，圖5中表示分光鏡之透光特性(使530 nm雷射反射，且使較540 nm更長波長之光透過)。

藉由將該等吸光濾光片及分光鏡如圖6所示配置於濾光片稜鏡而可容易地自吸收濾光片僅提取拉曼散射光。

[實施例4 細胞表面之拉曼散射光之藉由CCD相機之檢測]

例如，於實施例1之DNA適體係對K562白血病細胞具有親和性之DNA適體之情形，首先培養K562細胞。將活細胞與死細胞分離且僅提取活細胞。對所提取之K562細胞 1×10^6 細胞添加實施例1中所製作之表面增強拉曼散射粒子分散液5微升，於37℃下靜置1小時。其後，利用磷酸緩衝液清洗細胞之後以設置有實施例3記載之反射鏡單元之螢光顯微鏡觀察細胞表面。其結果藉由CCD相機觀察如圖7所示之來自細胞表面之拉曼散射光。

【符號說明】

- 1 光源
- 2 激發光
- 2-1 激發光(入射光)
- 2-2 激發光(反射光)
- 3 散射光

- 4 拉曼散射光
- 5 試樣
- 6 濾光片稜鏡
- 7 光分割元件(分光鏡)
- 8 吸光濾光片
- 9 受光零件(CCD相機)
- 10 來自K562細胞表面之拉曼散射光

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種檢測系統，其係使用使金屬奈米粒子與拉曼活性分子複合化之表面增強拉曼散射探針來檢測表面增強拉曼散射光之系統，且具備：

光源，其發射激發光；

第一光分割元件，其將自該光源以特定角度入射之激發光中之特定之波長域之光反射；

試樣，其係含有表面增強拉曼散射探針者，藉由來自該第一光分割元件之反射光之照射而發射散射光；

第二光分割元件，其係與上述第一光分割元件相同或不同之光分割元件，藉由該散射光之入射而使與上述特定之波長域不同之波長域之光透過；

吸光濾光片，其被照射所透過之散射光，且使該散射光中之特定之波長域之拉曼散射光通過；及

受光零件，其藉由通過該吸光濾光片後之拉曼散射光之入射而檢測表面增強拉曼散射。

【第2項】

如請求項1之檢測系統，其中上述第一光分割元件及第二光分割元件係相同之分光鏡，

上述特定角度為 $45^{\circ} \pm 10^{\circ}$ 。

【第3項】

如請求項2之檢測系統，其中上述分光鏡相對於上述入射之激發光之光軸以 $45^{\circ} \pm 10^{\circ}$ 而配置，

上述吸光濾光片進而具備落射螢光顯微鏡用濾光片稜鏡，其適合相對於上述透過之散射光之光軸以 $90^{\circ}\pm 20^{\circ}$ 而配置。

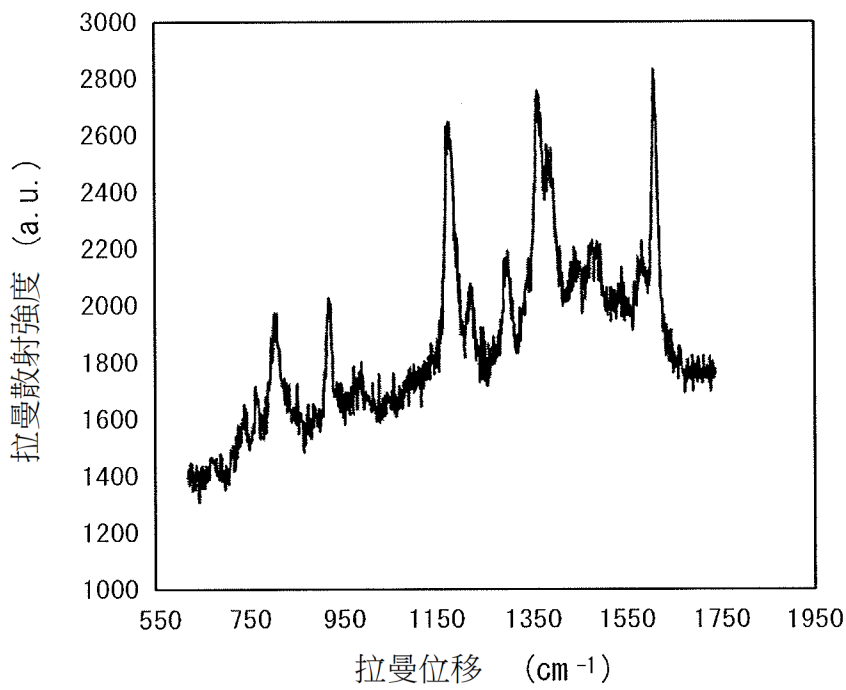
【第4項】

如請求項1至3中任一項之檢測系統，其中上述光源係雷射。

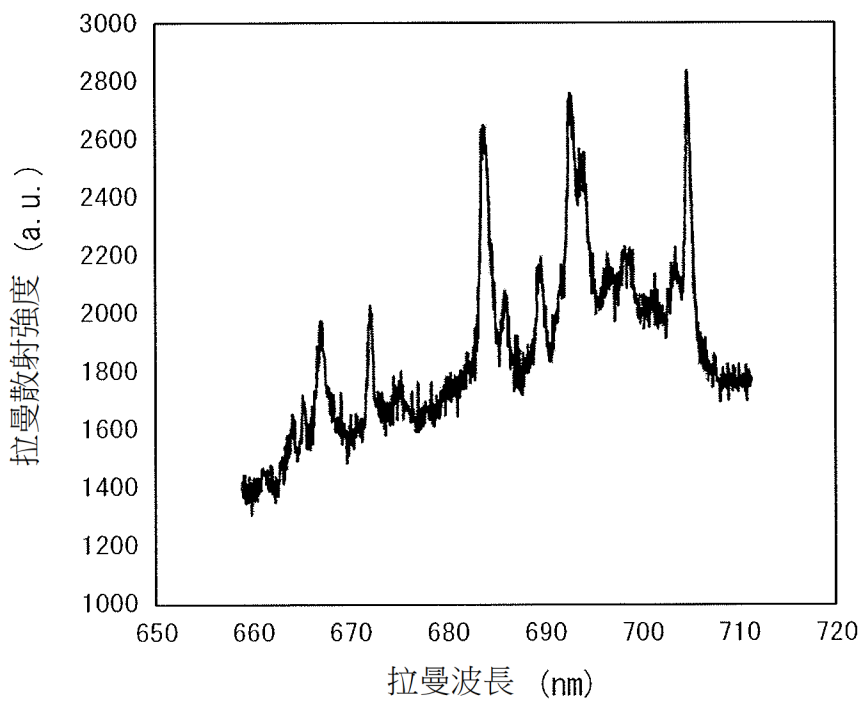
【第5項】

如請求項1至3中任一項之檢測系統，其中上述光源係氙弧燈、水銀燈或LED光源。

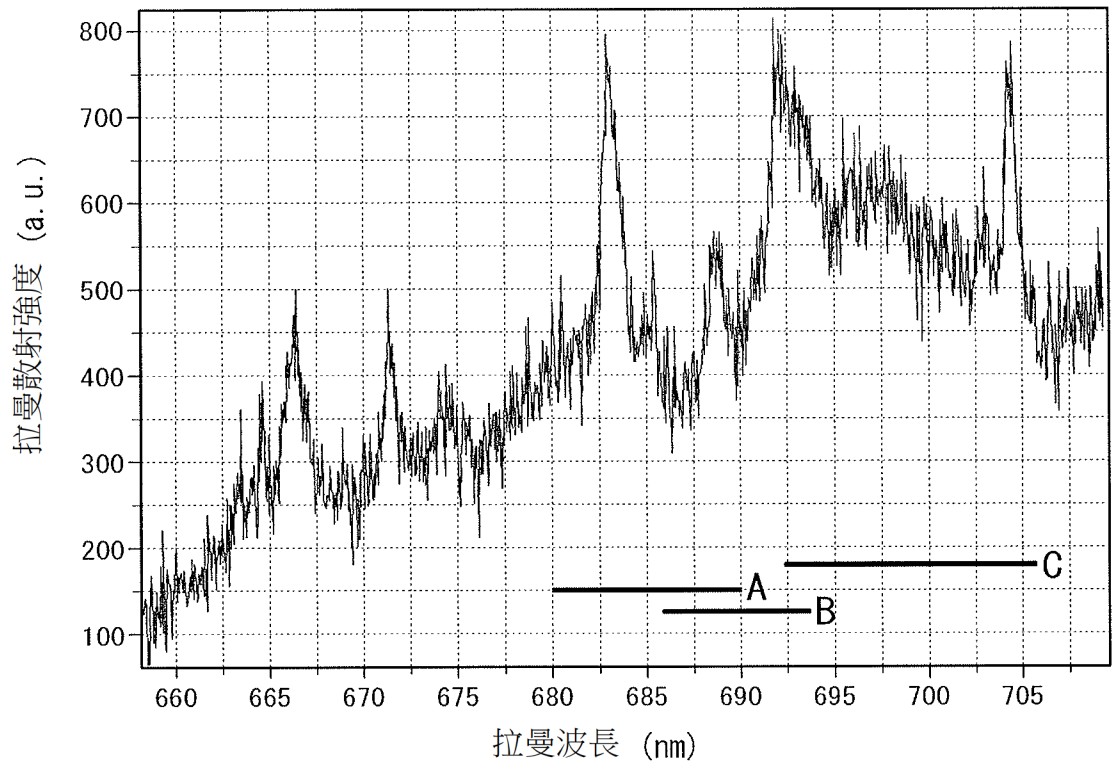
【發明圖式】



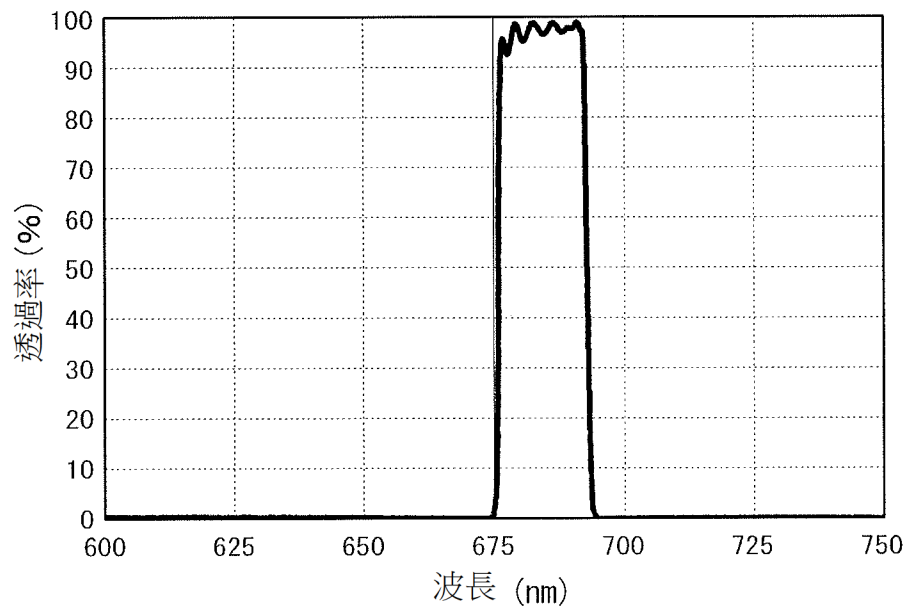
【圖1】



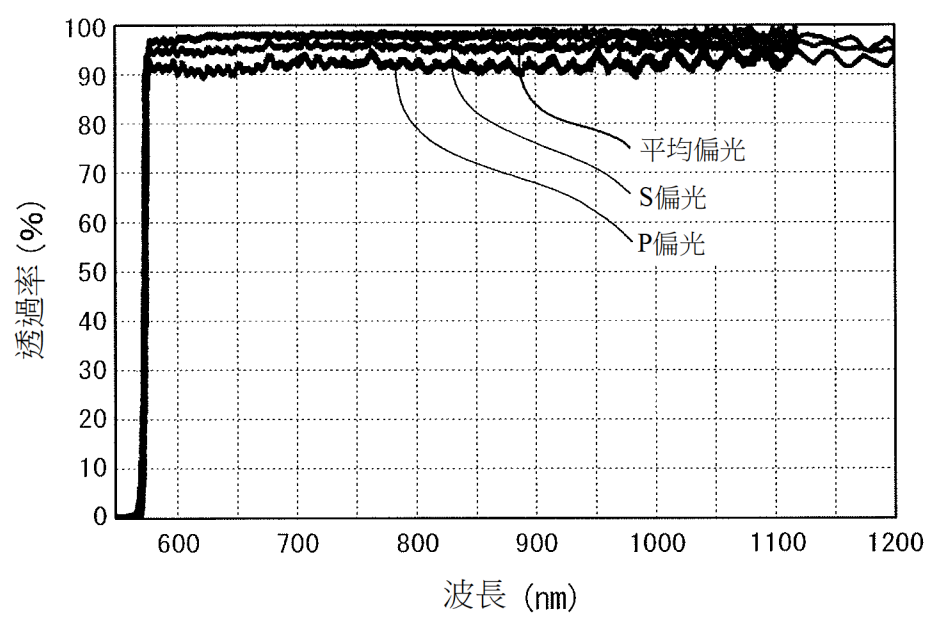
【圖2】



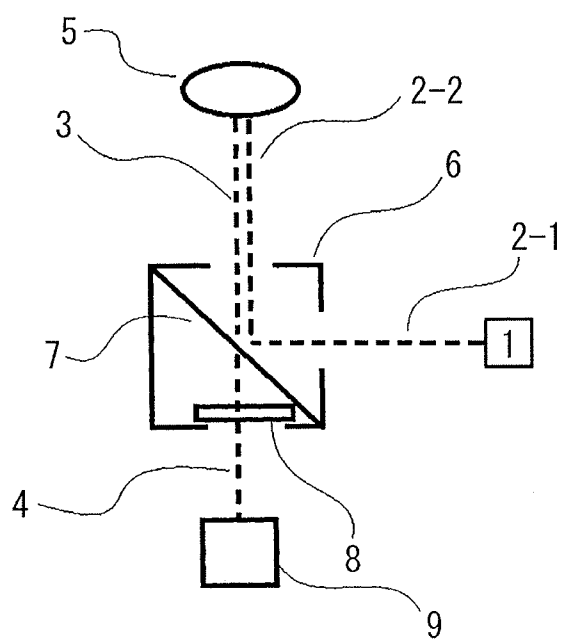
【圖3】



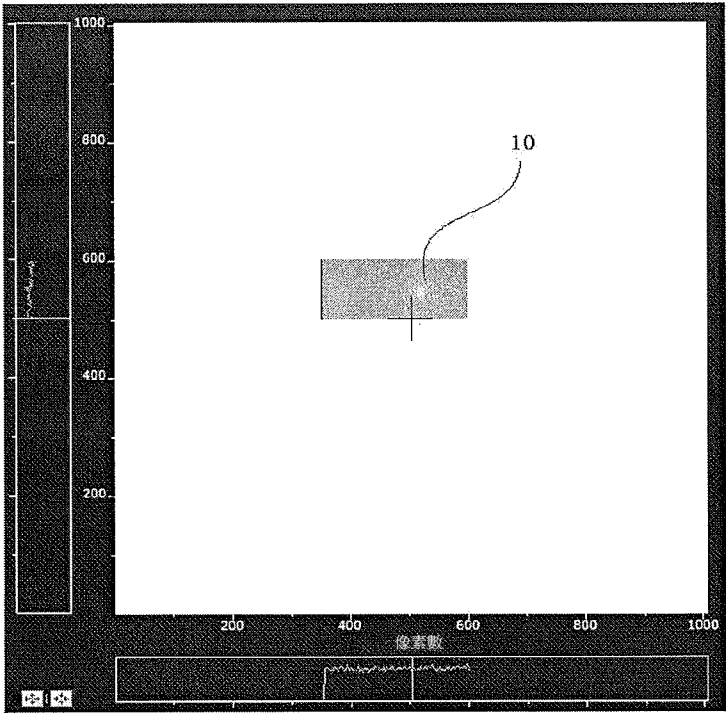
【圖4】



【圖5】



【圖6】



【圖7】