

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-503548

(P2009-503548A)

(43) 公表日 平成21年1月29日(2009.1.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 21/64 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/64 G	2 G O 4 3
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 9 5	
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2008-525130 (P2008-525130) (86) (22) 出願日 平成18年8月2日 (2006.8.2) (85) 翻訳文提出日 平成20年3月27日 (2008.3.27) (86) 国際出願番号 PCT/US2006/030003 (87) 国際公開番号 W02007/094817 (87) 国際公開日 平成19年8月23日 (2007.8.23) (31) 優先権主張番号 60/705, 216 (32) 優先日 平成17年8月2日 (2005.8.2) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 60/795, 110 (32) 優先日 平成18年4月26日 (2006.4.26) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 504260058 ユニバーシティ・オブ・ユタ・リサーチ・ ファウンデーション アメリカ合衆国ユタ州84108, ソルト ・レイク・シティ, アラビーン・ドライブ 615, スイート 100 (74) 代理人 100089705 弁理士 社本 一夫 (74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎 (74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰 (74) 代理人 100080137 弁理士 千葉 昭男 <div style="text-align: right;">最終頁に続く</div>
---	---

(54) 【発明の名称】 金属ナノキャビティを含むバイオセンサー

## (57) 【要約】

バイオ分子アッセイは、少なくともその一つの表面上に金属層を有する基板を含む。該金属フィルムはナノキャビティを含む。該ナノキャビティは、サンプル又はサンプル溶液中の1種類以上の分析物の存在若しくは量を表すシグナルを強化するように構成され、該シグナルを約2以上の係数で、又は約3以上の係数で強化するように構成されうる。このようなシグナル強化は、アレイ状に組織化されたナノキャビティ、ランダムに配置されたナノキャビティ、又は例えば波形若しくはパターン化のような増大した表面積特徴によって囲まれたナノキャビティ、又は縁長さを調節した四角形若しくは三角形の形状を有するナノキャビティによって、又は複数のナノ粒子によって達成されうる。バイオ分子基板の作製方法と、このようなバイオ分子基板を用いるアッセイ手法も開示する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生物学的アッセイのための検出強化要素であって、基板；該基板の少なくとも一つの面上の、少なくとも一つのナノキャビティを含む金属層；及び該少なくとも一つのナノキャビティ内のキャプチャー分子；を含む検出強化要素。

**【請求項 2】**

該基板が実質的に平面である、請求項 1 記載の検出強化要素。

**【請求項 3】**

該金属層が金を含む、請求項 1 記載の検出強化要素。

**【請求項 4】**

該少なくとも一つのナノキャビティが、サンプル中に存在する少なくとも一つの分析物の量を表すシグナルを強化するように構成されている、請求項 1 記載の検出強化要素。

**【請求項 5】**

該金属層が、基板と共に用いられ、少なくとも一つのナノキャビティ内のキャプチャー分子と、少なくとも一つの分析物及び競合分子との結合を表示する蛍光シグナルを強化するように構成されている、請求項 4 記載の検出強化要素。

**【請求項 6】**

該少なくとも一つのナノキャビティが、約 100 nm ~ 約 200 nm の幅を有する、請求項 1 記載の検出強化要素。

**【請求項 7】**

該幅が直径である、請求項 1 記載の検出強化要素。

**【請求項 8】**

該少なくとも一つのナノキャビティが、他のナノキャビティから平均して約 1.5 μm ~ 約 1 μm の間隔を置いて離れている、請求項 1 記載の検出強化要素。

**【請求項 9】**

アレイ状に組織化された、複数個のナノキャビティを含む、請求項 1 記載の検出強化要素。

**【請求項 10】**

該基板上にランダムに分布した、複数個のナノキャビティを含む、請求項 1 記載の検出強化要素。

**【請求項 11】**

該少なくとも一つのナノキャビティが、増大した表面積特徴によって囲繞されている、請求項 1 記載の検出強化要素。

**【請求項 12】**

生物学的アッセイのための検出強化要素であって、基板；該基板の少なくとも一つの面上の、複数個のナノ粒子を含む金属層；及び該ナノ粒子上のキャプチャー分子；を含む検出強化要素。

**【請求項 13】**

生物学的アッセイに用いるための装置であって、基板；該基板の少なくとも一つの面上の、複数個のナノキャビティを含む金属層；及び該複数個のナノキャビティ内のキャプチャー分子；を含む装置。

**【請求項 14】**

該複数個のナノキャビティに暴露された、該基板の少なくとも一つの面の領域に、該キャプチャー分子の少なくとも一部が固定されている、請求項 13 記載の装置。

**【請求項 15】**

該キャプチャー分子の少なくとも一部が、該複数個のナノキャビティ内の金属層の表面に固定されている、請求項 13 記載の装置。

**【請求項 16】**

該複数個のナノキャビティのうちのナノキャビティが、サンプル中に存在する少なくとも一つの分析物の量を表すシグナルを強化するように構成されている、請求項 13 記載の

10

20

30

40

50

装置。

【請求項 17】

該金属層が、該金属基板のキャビティ内のキャプチャー分子と、少なくとも一つの分析物及び競合分子との結合を表示する蛍光シグナルを強化するように構成されている、請求項 16 記載の装置。

【請求項 18】

該基板が石英を含む、請求項 13 記載の装置。

【請求項 19】

該金属層が金を含む、請求項 13 記載の装置。

【請求項 20】

該複数個のナノキャビティが増大した表面積特徴によって囲繞されている、請求項 13 記載の装置。

【請求項 21】

バイオ分子アッセイに用いるための装置であって、基板；該基板の少なくとも一つの面上の、複数個のナノ粒子を含む金属層；及び該ナノ粒子上のキャプチャー分子；を含む装置。

【請求項 22】

バイオ分子アッセイを組み立てるための方法であって、基板を形成する工程；該基板の少なくとも一つの面上に金属フィルムを沈着させる工程；該金属フィルム内に複数個のナノキャビティを形成し、該ナノキャビティの少なくとも一部には該基板の少なくとも一つの面上の対応する面積を露出させる工程；及び該複数個のナノキャビティの少なくともナノキャビティ中にキャプチャー分子を導入する工程を含む方法。

【請求項 23】

バイオ分子アッセイの金属フィルム内に形成されたナノキャビティ中にサンプル若しくはサンプル溶液を導入する工程；バイオ分子アッセイの基板中に少なくとも一つの波長の電磁線を導入し、該電磁線の少なくとも一部を該基板内で内部反射させる工程；該ナノキャビティからの、サンプル中に存在する少なくとも 1 種類の分析物の存在若しくは量を表す、少なくとも一つの強化シグナルを検出する工程を含むバイオ分子アッセイ方法。

【請求項 24】

該ナノキャビティが、約 2 以上の係数で該シグナルを強化するように構成されている、請求項 4 記載の検出強化要素。

【請求項 25】

該ナノキャビティが方形である、請求項 24 記載の検出強化要素。

【請求項 26】

該ナノキャビティが、約 125 nm の縁長さを有する、請求項 25 記載の検出強化要素。

【請求項 27】

該ナノキャビティが三角形である、請求項 24 記載の検出強化要素。

【請求項 28】

該ナノキャビティが、約 3 以上の係数で該シグナルを強化するように構成されている、請求項 4 記載の検出強化要素。

【請求項 29】

該ナノキャビティが三角形である、請求項 28 記載の検出強化要素。

【請求項 30】

該ナノキャビティが、約 175 nm 長さである縁を有する、請求項 29 記載の検出強化要素。

【請求項 31】

該金属層が金を含む、請求項 30 記載の検出強化要素。

【請求項 32】

該金属層が約 100 nm の厚さを有する、請求項 31 記載の検出強化要素。

10

20

30

40

50

## 【請求項 33】

バイオ分子アッセイに用いるための装置の設計方法であって、基板を構成する工程と；  
該基板の少なくとも一つの面上に包含され、かつサンプル中の分析物の量を表すシグナル  
を強化する複数個のナノキャビティを含む金属層を構成する工程を含む方法。

## 【請求項 34】

該金属層を構成する工程が、該金属層を約 100 nm の厚さを有するように構成するこ  
とをさらに含む、請求項 33 記載の方法。

## 【請求項 35】

金属層を複数個のナノキャビティを含むように構成する工程が、該複数個のうちの少な  
くとも一つのナノキャビティを、約 2 以上の係数で該シグナルを強化するように構成する  
ことを含む、請求項 33 記載の方法。

10

## 【請求項 36】

少なくとも一つのナノキャビティの構成が、該少なくとも一つのナノキャビティを、該  
シグナルを強化する形状を有するように構成することを含む、請求項 35 記載の方法。

## 【請求項 37】

少なくとも一つのナノキャビティの構成が、該少なくとも一つのナノキャビティを、該  
シグナルを強化する寸法を有するように構成することをさらに含む、請求項 36 記載の方  
法。

## 【請求項 38】

少なくとも一つのナノキャビティの構成が、該少なくとも一つのナノキャビティを、約  
3 以上の係数で該シグナルを強化するように構成することを含む、請求項 35 記載の方法  
。

20

## 【請求項 39】

少なくとも一つのナノキャビティの構成が、該少なくとも一つのナノキャビティを、形  
状において三角形であるように構成することを含む、請求項 38 記載の方法。

## 【請求項 40】

少なくとも一つのナノキャビティの構成が、該少なくとも一つのナノキャビティの辺を  
、それぞれ約 175 nm の長さを有するように構成することを含む、請求項 39 記載の方  
法。

## 【請求項 41】

バイオ分子アッセイを組み立てる方法であって、  
基板を形成する工程；

30

該基板の少なくとも一つの面上に金属フィルムを沈着させる工程；

該金属フィルム内に複数個のナノキャビティを形成し、該ナノキャビティの少なくとも一  
部には該基板の少なくとも一つの面上の対応する面積を露出させる工程；

該複数個のうちの少なくとも一つのナノキャビティを、キャプチャー分子による分析物の  
結合を表すシグナルを約 2 以上の係数で強化するように構成する工程；及び

該複数個のナノキャビティのうちの少なくとも幾つかのナノキャビティ中にキャプチャー  
分子を導入する工程を含む方法。

## 【請求項 42】

40

バイオ分子アッセイ方法であって、

バイオ分子アッセイの金属フィルム内に形成されたナノキャビティ中にサンプル若しくは  
サンプル溶液を導入する工程；

バイオ分子アッセイの基板中に少なくとも一つの波長の電磁線を導入し、該電磁線の少な  
くとも一部を該基板内で内部反射させる工程；

該金属フィルムと其中的少なくとも一つのアパーチャの構成が、サンプル中に存在する  
少なくとも 1 種類の分析物の存在を表すシグナルを約 2 以上の係数で増幅して、少なく  
とも一つの強化シグナルを発生させる工程；

該少なくとも一つの強化シグナルを検出する工程を含む方法。

## 【請求項 43】

50

金属層の構成が、該金属層を約 50 nm ~ 約 100 nm の厚さを有するように構成することをさらに含む、請求項 33 記載の方法。

【請求項 44】

該金属層が、約 50 nm ~ 約 100 nm の厚さを有する、請求項 31 記載の検出強化要素。

【請求項 45】

該ナノキャビティが、約 6 以上の係数でシグナルを強化するように構成される、請求項 4 記載の検出強化要素。

【請求項 46】

該ナノキャビティが、約 12 以上の係数でシグナルを強化するように構成される、請求項 4 記載の検出強化要素。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、“金属ナノキャビティを含むバイオセンサー”に関する 2005 年 8 月 2 日出願の米国仮特許出願第 60/705,216 号（この全内容は本明細書に援用される）の利益を主張する。本出願はさらに、“最適放射線強化を与えるように構成された金属ナノキャビティ”に関する 2006 年 4 月 26 日出願の米国仮特許出願第 60/795,110 号（この全内容は本明細書に援用される）の利益を主張する。

【0002】

連邦支援研究又は開発に関する陳述

本発明は部分的に、National Science Foundation(NSF)によって授与される Contract No. ECS-0134548 及び National Institute of Health(NIH) によって授与される Contract No. 1R21EB000481-01 のもとでの政府支援によって行なわれたものである。政府は本発明にある一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明は一般的に、エバネッセント波型バイオセンサー(evanescent wave-type biosensor)、又はバイオ分子アッセイに関する。さらに詳しくは、本発明は、その一つ以上の面上に金属フィルムを有する基板を含むバイオセンサー、特に、サンプル中に存在する一つ以上の分析物の存在若しくは量を表すシグナルの増幅を最適化するように構成された形状のナノキャビティを含む金属フィルムを有するバイオセンサーに関する。

【0004】

背景

プラズモニクスとは、金属表面における電子ガス（又はプラズマ）と電磁線との相互作用に関連した現象の研究である（B. Schechter “Bright new world,” New Scientist 31-33(2003)）。現在一般的な表面プラズモン共鳴（SPR）に基づくセンサー（B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundstrom, "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing," Sen. Actuators, vol. 4, pp. 299-304, 1983; N. Bianchi, C. Rustigliano, M. Tomassetti, G. Feriotto, F. Zorzato, and R. Gambari, "Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction," Clin. Diagnostic Virology, vol. 8, pp. 199-208, 1997）を別として、プラズモニクス(plasmonics)は、バイオセンシングにおいて、光散乱ラベルとして用いるために金属ナノ粒子を分子に取り付けることによって分子検出用途に適用されている（J. Yguerabide and E. E. Yguerabide, "Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications," Anal. Biochem., vol. 262, no. 2, pp. 157-176, Sep. 1998; T. A. Taton, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger, "Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes," Science, vol. 289, p

10

20

30

40

50

p. 1757-1760, 2000; L. R. Hirsch, J. B. Jackson, A. Lee, N. J. Halas, and J. L. West, "A whole blood immunoassay using gold nanoshells," *Anal. Chem.*, vol. 75, p. 2377, 2003)。ナノ構造金属表面も、表面強化蛍光発光 (A. Wokaun, H.-P. Lutz, A. P. King, U. P. Wild, and R. R. Ernst, "Energy transfer in surface enhanced luminescence," *J. Chem. Phys.*, vol. 79, no. 1, pp. 509-514, 1983; J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, "Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dye- labeled oligonucleotides," *Anal. Biochem.*, vol. 315, pp. 57-66, 2003) と、ラマン散乱 (S E R S) (K. Kneipp, H. Kneipp, R. Manoharan, E. B. Hanlon, I. Itzkan, R.R.Dasari, and M. S. Feld, "Extremely large enhancement factors in surface-enhanced Raman scattering for molecules on colloidal gold clusters," *Appl. Spectrosc.*, vol. 52, pp. 1493-1497, 1998) に関して広範囲に研究されている。これらの表面強化手法の主要な欠点の一つは、蛍光発光又はラマン強化要素が該表面上の“ホットスポット”によって実証されるように空間変動的であるほど、該ナノ構造が不規則である (但し、時には、フラクタルオーダを含む) ことである (V. M. Shalaev, R. Botet, J. Mercer, and E. B. Stechel, "Optical properties of self-affine thin films," *Phys. Rev. B*, vol. 54, pp. 8235-8242, 1996)。該ホットスポット効果が、特にアレイフォーマットにおける定量アッセイにこれらの手法を不適切なものにする可能性がある、というのは、一定の感知帯にわたる平均的強化があまり高度ではなく、該強化が帯ごとに变化する可能性があるからである。その結果、リソグラフィック的に限られたアレイの金属ナノ粒子に分子を取り付けることに努力がなされている (H. Ditlbacher, N. Felidj, J. R. Krenn, B. Lambrecht, A. Leitner, and F. R. Aussenegg, "Electromagnetic interaction of fluorophores with designed 2D silver nanoparticle arrays," *Appl. Phys. B*, vol. 73, p. 373, 2001; N. Felidj, J. Aubard, G. Levi, J. R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner, and F. R. Aussenegg, "Optimized surface-enhanced Raman scattering on gold nanoparticle arrays," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 82, no. 18, pp. 3095-3097, 2003)。これらの構造によると、ナノ粒子のサイズ、形状及び間隔の均一性は、大きさ及び空間的位置に関して明確な強化を生じる。しかし、均一な照明はナノ粒子間に位置する分子からの蛍光発光を刺激する可能性があり、これらがデテクターにおいてバックグラウンド・シグナルを生じるので、これらの手法は、非結合種によって生じるバックグラウンドからの完全な単離を可能にしない。

#### 【 0 0 0 5 】

重要な最近の進歩は、ナノキャビティの不存在下で光が金属フィルムを通過しない場合に、サブ波長の金属アパーチャの周期的アレイ (T. W. Ebbeson, H. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, and P. A. Wolff, "Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays," *Nature*, vol. 391, pp. 667-669, 1998) 若しくはナノキャビティを通しての特別な光伝達の実証である。これが今まで非常に活発な研究分野であったにも関わらず、伝達強化の起源についての意見の相違がなお存在する (H. J. Lezec and T. Thio, "Diffracted evanescent wave model for enhanced and suppressed optical transmission through subwavelength hole arrays," *Optics Express*, vol. 12, no. 16, pp. 3629-3651, 2004)。しかし、ナノキャビティの周期的アレイが、特定の入射角での光が自由空間からいずれの金属界面上の表面プラズモン・ポラリトン (S P P) Blochモード中にも連結することを可能にする二次元回折格子として作用することが、一般に信じられている (I. Avrutsky, Y. Zhao, and V. Kochergin, "Surface-plasmon-assisted resonant tunneling of light through a periodically corrugated thin metal film," *Opt. Lett.*, vol. 25, pp. 595-597, 2000; A. K. Sarychev, V. A. Podolsky, A. M. Dykhne, and V. M. Shalaev, "Resonance transmittance through a metal film with subwavelength holes," *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 38, pp. 956-963, 2002; L. Martin-Moreno and F. J. Garcia-Vidal, "Theory of extraordinary optical transmission through subwavelength hole arrays," *Opt. Express*, vol. 12, pp. 3619-3628, 2004.5)。これらの S P P モードは、ナノキャビティ内に建設的に干渉して、強度強化をもたらすこ

とができ(H. J. Lezec and T. Thio, "Diffracted evanescent wave model for enhanced and suppressed optical transmission through subwavelength hole arrays," Optics Express, vol. 12, no. 16, pp. 3629-3651, 2004)、それ故、より大きな伝達を生じることができる。本発明者らは、光が実際にナノキャビティ内に局在すること(Y. Liu and S. Blair, "Fluorescence enhancement from an array of subwavelength metal apertures," Opt. Lett, vol. 28, pp. 507-509, 2003)、及び強化された蛍光発光変換(enhanced fluorescence transduction)が行なわれうること(Y. Liu, J. Bishop, L. Williams, S. Blair, and J. N. Herron, "Biosensing based upon molecular confinement in metallic nanocavity arrays," Nanotechnology, vol. 15, pp. 1368-1374, 2004; Y. Liu and S. Blair, "Fluorescence transmission through 1-D and 2-D periodic metal films," Opt. Express, vol. 12, no. 16, pp. 3686-3693, 2004)を、局部強度プローブとして発蛍光団を用いて、実験的に実証している。

10

#### 【0006】

さらに最近では、単分子蛍光発光の強化が円形ナノアパーチャに関して(H. Rigneault, J. Capoulade, J. Dittinger, J. Wenger, N. Bonod, E. Popov, T.W. Ebbesen, and P.-F. Lenne, "Enhancement of single-molecule fluorescence detection in subwavelength apertures," Physical Review Letters 95, 117401 (2005))及び長方形ナノアパーチャに関して(J. Wenger, P.-F. Lenne, E. Popov, H. Rigneault, J. Dittinger, and T. W. Ebbesen, "Single-molecule fluorescence in rectangular nano-apertures," Optics Express 13, 7035-7044 (2005))報告されており、放射線強化に関するコンピュータによるモデルが開発されている(Y. Liu, F. Mahdavi, and S. Blair, "Enhanced fluorescence transduction properties of metallic nanocavity arrays," IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics 11, 778-784 (2005))。

20

#### 【0007】

多重分析物、又はアレイ、バイオセンシングは、多くの臨床的用途、環境的用途及び産業的用途に関してますます重要な研究開発分野である。例えば、遺伝的スクリーニングの臨床的用途では、多重の遺伝子型又は突然変異の存在下で遺伝的障害を迅速に同定するために高感度ハイブリダイゼーション・アレイが必要である(B. J. Maron, J. H. Moller, C. E. Seidman, G. M. Vincent, H. C. Dietz, A. J. Moss, H. M. Sondheimer, R. E. Peyeritz, G. McGee, and A. E. Epstein, "Impact of laboratory molecular diagnosis on contemporary diagnostic criteria for genetically transmitted cardiovascular diseases: hypertrophic cardiomyopathy, long- QT syndrome, and Marfan syndrome," Circulation 98, 1460- 1471 (1998); J. G. Hacia "Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays," Nature Genetics 21, 42-47 (1999))。

30

#### 【0008】

しかし、例えば、アッセイの感度、正確さ、精度及び特異性の改良、アッセイ時間の短縮といったような、多くの試練がこの分野に依然として残っている。

#### 発明の開示

バイオ分子アッセイは、その少なくとも一つの面上に金属フィルム若しくは金属層を有する基板を含む。該金属フィルムはナノキャビティを含む。該ナノキャビティは、サンプル又はサンプル溶液中の一つ以上の分析物(例えば、タンパク質若しくはペプチド、核酸、小分子リガンド、イオン等)の存在又は量を表すシグナルを強化するように構成される。このようなバイオ分子アッセイは、非限定的に、受容体-リガンド結合、薬物スクリーニング、リアルタイム核酸ハイブリダイゼーション、臨床的診断等を含めた、多様な目的のために用いることができる。

40

#### 【0009】

バイオ分子アッセイは、適当な材料(例えば、ガラス、石英、他の光学的に適した(例えば、透明な)無機物質、光学的プラスチック、上記のいずれかの組み合わせ(多重層を含む、いわゆる“薄フィルム”導波管の場合におけるように)等)から基板若しくはサポートを形成することによって組み立てることができる。金属フィルム若しくは層を、該基

50

板の少なくとも一つの面上に付与する（例えば、沈着法、積層法等によって）。非限定的な例としては、該金属フィルムは約 100 nm の厚さを有することができる。

【0010】

該金属フィルム内に、適当な方法（例えば、マスク及びリフトオフ方法（例えば、半導体デバイス作製に用いる方法）、レーザーによるマスク及びエッチング方法（例えば、半導体デバイス作製に用いる方法）等）によって、ナノキャビティを形成する。該金属フィルムを完全に通過させて、該ナノキャビティを拡張して、該ナノキャビティを通して下方の基板を露出させることができる。各ナノキャビティの横方向寸法（例えば、直径）は、金属層の厚さとほぼ同じであることができるが、横方向ナノキャビティ寸法は金属層の厚さと異なることも可能である。

10

【0011】

実質的に任意の形状のナノキャビティを形成することができる。ナノキャビティの形状の例は、非限定的に、円形（例えば、円形、長円形、楕円形、卵形等）、四角形（例えば、方形、長方形、平行四辺形、台形等）、三角形、及び他の多角形の形状を包含する。金属フィルム内に形成されるナノキャビティは全て、実質的に同じ形状及び寸法を有することができる、又は多様な形状及び寸法のナノキャビティを、本発明の教えを具体化するバイオ分子アッセイの金属フィルムに含めることができる。

【0012】

金属フィルム上の表面モード若しくは波型への入射光の結合を容易にするような形式で、ナノキャビティを配置することができ、いずれの表面モードも建設的にナノキャビティ内に干渉することができる。例えば、入射光を基板から、即ちバイオ分子アッセイの裏面から導いて、反対側の、バイオ分子アッセイの上面（即ち、金属フィルムを有する面）に隣接した位置における蛍光を検出すべき場合には、該金属フィルムが金属基板上に存在するバルク溶液中の発蛍光団の励起を妨害する。他の例として、入射光を金属フィルムの上方の位置からバイオ分子アッセイに向けて導いて、基板の裏面に隣接する位置で検出が行なわれる場合には、溶液中に留まるマーカー分子が状態の変化（例えば、蛍光マーカー分子による蛍光発光）を受けるとしても、金属フィルム上の溶液中に留まるマーカー分子は実質的に検出されずに留まる。この理由は、金属フィルムの上方の位置から放射される光が金属フィルムを通過せず、また各ナノキャビティのサイズがあまりに小さすぎて、金属フィルム上の位置から放射される蛍光がそれを通過できないからである。しかし、ナノキャビティ内で発生される蛍光は、ナノキャビティから出て、ナノキャビティを形成する物質によって並びにナノキャビティの構造及び寸法によって強化される。

20

30

【0013】

しかし、特定の用途では、該キャビティの外側にある蛍光性種に起因する蛍光シグナルが問題になる可能性がある。例えば、これらのシグナルが、アッセイのバックグラウンド又はノイズを高める可能性があり、そのために、アッセイの感度又は正確さを危うくする可能性がある。該キャビティの外側にある蛍光性種に起因する蛍光シグナルの部分的又は完全な単離は、蛍光収集角度を狭くする、又は該金属フィルムの表面を不動態化するのいずれかによって達成することができる。

【0014】

該ナノキャビティの形状は、シグナル増幅を最適化するように構成することができる。円形、方形及び三角形を含めた、多様な形状のナノキャビティが、該ナノキャビティの寸法（例えば、円形ナノキャビティの直径、方形及び三角形のナノキャビティの縁の長さ等）に依存して、良好な度合いの放射線強化若しくはシグナル強化を生じることが、発見されている。方形ナノキャビティは円形ナノキャビティよりも良好なシグナル強化を与えることができるが、三角形ナノキャビティはさらに大きなシグナル強化を与えることができる。本発明の範囲を限定する訳ではなく、約 100 nm の厚さを有する金フィルム中に形成された円形ナノキャビティは約 1.8 倍まで（約 160 nm の直径を有するナノキャビティでは）シグナルを強化することができ、約 100 nm の厚さを有する金フィルム中に形成された方形ナノキャビティは約 2.1 ~ 2.2 倍まで（約 125 nm の長さで 20 nm

40

50



mの半径角の縁を有するナノキャビティでは)シグナルを強化することができ、約100nmの厚さを有する金フィルム中に形成された正三角形ナノキャビティは約3倍まで(約175nm長さで、20nm半径角である縁を有するナノキャビティでは)シグナルを強化することができる。ナノキャビティの形状又は寸法をさらに調整することによって、より大きな、放射線若しくはシグナル強化を達成しうると考えられる。

#### 【0015】

本発明によるバイオ分子基板は、ナノキャビティに入射光を導くために、基板と金属フィルムとの間に又は金属フィルム上に配置した、一つ以上の透明フィルムを任意に含むことができる。ナノキャビティは、このような透明フィルム中に又はこのような透明フィルムを通して拡張することができる。

10

#### 【0016】

バイオ分子基板の表面は、キャプチャー分子(又はベイト分子)がその好ましくない位置に付着する又は固定化されるのを防止するために、不動態化することができる。該金属フィルムの表面は、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)-チオール、他の金属(例えば、金)-選択的チオール分子によって、又はキャプチャー分子が金属フィルムに固定化されるのを防止する若しくは金属フィルムへのキャプチャー分子の固定化を弱める、任意の他の物質によって不動態化することができる。したがって、その代わりに、該キャプチャー分子は、該ナノキャビティに暴露された及び該ナノキャビティ内に又は該ナノキャビティに隣接して位置する基板面に固定化される。或いは、基板の露出面を、キャプチャー分子が該基板に付着するのを防止して、むしろ、キャプチャー分子を金属表面のみに固定化させるために、不動態化することができる(例えば、PEGシランによって)。他の代替手段として、金属フィルムの主要面を塗膜(coating film)(例えば、他の透明フィルム)によって覆うことができ、該塗膜の露出面並びに該塗膜と該金属フィルムとを通して露出された基板面を不動態化して、各ナノキャビティの表面の一部を形成する、金属フィルムの非不動態化露出縁のみにキャプチャー分子を付着させることができる。

20

#### 【0017】

バイオ分子基板は、金属フィルム面に又はナノキャビティによって露出された基板面の一部に表面モード(例えば、エバネッセント場を生じる表面プラズモン)を発生させるような形式で、構成することができる。これらの表面モード、特に、相互に建設的に干渉する表面モードは、ナノキャビティ内のキャプチャー分子に結合している分析物上のマーカ分子の励起を強化することができる。

30

#### 【0018】

キャプチャー分子をナノキャビティ中に導入して、当該技術分野で知られているように、ナノキャビティ、基板又は両方に固定化する。該キャプチャー分子は、問題の一つ以上の分析物に対して特異的である。

#### 【0019】

増大した表面積構造、例えば、“ブルズアイ”構造を有する波形パターン、その他のパターン等を、各ナノキャビティの周囲に形成することができる。

ナノキャビティは、例えば、ナノキャビティの周期的アレイ、ナノキャビティのランダム・アレイ、及び環状波形格子によって囲まれた単ナノキャビティの“ブルズアイ”構造のような、ナノ構造アーキテクチャ(nanostructure architecture)状態に配列することができる。ナノ構造アーキテクチャの幾つかの実施態様を図1に、本明細書に記載するとおりに例示する。

40

#### 【0020】

金属ナノ粒子の周期的アレイも、金属ナノ粒子が本質的に融合して、周期的孔アレイを形成するので、強化されたシグナルを与えることができる。ナノ粒子アレイの例を図1(c)に、本明細書に記載するとおりに例示する。

#### 【0021】

このようなバイオ分子アッセイは、サンプルがナノキャビティ中に連続的に流入する連続デリバリー系を含むことができる。連続デリバリー系は、少量のサンプルによると同様

50

に、低濃度の分析物を検出するために有用である。もちろん、サンプルの部分流が並行してそれを通して流動することができるセクションを有するデリバリー系を含めて、他の種類のデリバリー系も、本発明の範囲内である。

【0022】

サンプルは該デリバリー系を通して一度流動した後に、該系を通して1回以上再循環することができる。再循環は各回同じ方向で系を通して流動するループ内で行なうことも、又はサンプルがデリバリー系を通して流動する方向を逆転させることによって行なうことも可能である。再循環は、サンプル中の低分析物濃度の検出を最適化するために、又は少量のサンプル中の分析物を検出するために有用でありうる。

【0023】

連続的又は任意の他の構成のデリバリー系を通るサンプル流動は、バイオ分子アッセイ上に構築される又はバイオ分子アッセイとアセンブルされるメカニズムによって行なわれる。流動ファシリテータ(flow facilitator)の例は、非限定的に、蠕動ポンプ、正圧系(positive pressure system)、及び負圧系(negative pressure system)を包含する。

【0024】

例えば、米国特許出願no.10/350,361(Jan.23,2003出願)(これの開示はその全体で本明細書に援用される)に開示されているような混合構造。このような混合構造は、有利になるように本発明を組み入れる又は用いることができるバイオ分子アッセイのサンプル・デリバリー系に含めることも可能である。さらに又はバイオ分子アッセイの反応サイトに設置する代替手段として、反応サイト間及び該系の末端を含めた、サンプル・デリバリー系の他の位置に沿って混合構造を配置することができ、このような位置で混合構造は、サンプルがデリバリー系を通して再循環する前にサンプルの均質性を高めることができる。

【0025】

連続デリバリー系、サンプル再循環、サンプル流動ファシリテーション、サンプル混合又はこれらの任意の組み合わせの使用は、サンプル中の分析物の検出に必要な試薬量を減ずることができる。

【0026】

非限定的な例として、バイオ分子アッセイは蛍光検出法を用いるアッセイ系又は手法に用いることができる。このような系はさらに、電磁線の供給源とデテクターをも含む。該供給源は、該系に用いられることになる蛍光色素分子を励起させる、一つ以上の波長の電磁線若しくは“入射光”を放射するように構成され、そして該電磁線をナノキャビティ上又は基板中に導くように配向される。入射光は供給源から伝達される光の形であることができ、光として発生されるエバネッセント場が、導波管を含む基板若しくは透明フィルム又はこれらの組み合わせ中に導かれて、内部反射される。放射線は直接、場合によってはナノキャビティの配置のために生じる建設的干渉のために、ナノキャビティを浸透して、ナノキャビティ内の種を励起させることができる、又は放射線は基板内で内部反射されて、その一つ以上の面にエバネッセント場を形成することができる。入射光は、ナノキャビティ内のキャプチャー分子に関連して用いられるアッセイ結合法(例えば、サンドイッチ型アッセイ、結合競合アッセイ等)に依存して、直接又は間接的に固定された蛍光色素分子を励起させる。ナノキャビティ内の蛍光色素分子は励起すると、それによって、電磁線を放射する。この電磁線はナノキャビティと金属基板によって強化される。その後、該電磁線はデテクターによって検出される。デテクターに付随したアパーチャは該蛍光色素分子によって放射される電磁線の収束コーン(collection cone)の角度を調整することができる。

【0027】

本発明の教えを取り入れたバイオ分子アッセイは、既知の質量検出方法によって用いることができる。

一つの例として、既知濃度の基準分析物と未知濃度を有するサンプル中の分析物とを、異なるマーカー分子(例えば、異なる波長若しくは色の光を放射する蛍光分子)で標識して、ナノキャビティ内に固定されているキャプチャー分子へのそれらの結合を比較して、

10

20

30

40

50

該サンプル中の分析物の量を表示する。該キャプチャー分子に対する基準分析物と該サンプル分析物とのアフィニティは知ることができ、同じであることも異なることもありうる。

#### 【0028】

もちろん、化学ルミネセンス、光ルミネセンス、エレクトロルミネセンス、及びその他の種類（すなわち、蛍光ではない）のマーカー分子（例えば、ラマン散乱法に用いる金マーカーのような金属マーカー等）を用いる系及び手法も本発明の範囲内である。

#### 【0029】

本発明の他の特徴及び利点は、この後の記載、添付図面及び特許請求の範囲の考察によって、当業者に明らかになるであろう。

発明を実施するための最良の態様

本発明は、金属ナノキャビティを含むバイオセンサーを包含し、それによって、装置、装置の要素、並びにこのような装置の構築及び使用方法を提供する。以下の説明では、例示のために、本発明のいくつかの実施態様を示す添付図面を参照する。

#### 【0030】

図2(a)と(b)は、それぞれ、ナノキャビティ22、32のランダム配置アレイ20と周期的配置アレイ30を示す。図2(c)は、石英基板38の面36上の金属層34（中実黒色長方形によって表示）上の形成を示す図2(b)の断面28を示す。図2(c)は、さらに光路40、41及び42、並びにナノキャビティの幾何学的パラメーターd及びを示す、この場合、dは、ナノキャビティの直径であり、は、隣接ナノキャビティの間隔である。図2(c)に示すように、入射光40が、金属層34上の位置48からナノキャビティ32方向に導かれるときに、ナノキャビティ32内の蛍光分子の強化された蛍光出力を基板38の裏面46に隣接した位置44で、検出することができる。例えば、ナノキャビティ内の蛍光分子の蛍光出力は、基板の裏面46から標準蛍光スキャナー（すなわち、垂直入射励起、垂直入射蛍光集束）を用いて読み取ることができる。しかし、蛍光出力は、本明細書に記載するような伝達モードではなく、反射モードで検出することもできる。

#### 【0031】

アッセイの標的又はキャプチャー分子は、ナノキャビティの側壁、底面、又は側壁及び底面の両方に、存在することができる。2つのナノキャビティの実施態様が図3に例示される：タイプI（図3(c)に示すような）、ここで、キャプチャー分子54（例えば、プローブオリゴヌクレオチド）は、ナノキャビティの底58に選択的に付着し、タイプII（図3(d)に示すような）、ここで、プローブ54は、ナノキャビティの側壁60に選択的に付着する。図3(a)に示すように、ハイブリダイゼーション・アレイ130は、金属ナノキャビティの一つ以上のサブアレイ若しくは周期的アレイ30を含み、これらの内部では、キャプチャー若しくはプローブ、オリゴヌクレオチド54が、ナノキャビティ32に直接連結する。一つの分子種62（すなわち、蛍光標識された、標的オリゴヌクレオチド若しくは分析物）は、ハイブリダイゼーションを通して、キャプチャー・オリゴヌクレオチド54に特異的に結合する。光学的変換されたリアルタイム・シグナルは、サンプル溶液が導入され、それによって、非結合種から単離している側とは反対のセンサーアレイの側から、結合した標的オリゴヌクレオチドの数に比例して、検出されて、ウォッシュ・アッセイにおける検出シグナルの有意な部分を表すことができる。このナノキャビティアレイ・キテクチャーでは、図1(a)に示すように、非結合種98からの蛍光は、ナノキャビティにおいてを除いて、不透明な金属に浸透しない。リアルタイムでハイブリダイゼーション動力学を測定することによって、非特異的結合も考慮する(factor out)ことができる。この2つの実施態様を用いる蛍光強化の研究は、また、底面（タイプI）及び側壁（タイプII）に位置する分子の強化因子を独立かつ直接的に測定することを可能にする。

#### 【0032】

しかし、周期的ナノキャビティ構造の露出した金属表面に密接に近接して配置された発

10

20

30

40

50

蛍光団は、表面プラズモンに結合し、特定の角度で基板の裏側から発光することができる。この蛍光シグナルからの単離は、集束角を狭めてこの寄与を排除するか、又は金属フィルムの表面を不動態化することによって得ることができる。

#### 【0033】

キャプチャー分子がナノキャビティの望ましくない位置に結合することを防止するために、金属フィルムの表面又は基板の表面を不動態化することができる。例えば、タイプIナノキャビティ(図3(c))のためには、金属フィルム34の表面64をポリエチレングリコール(PEG)-チオールで不動態化することができる。したがって、プローブオリゴヌクレオチド(すなわち、キャプチャー分子)は、ナノキャビティ32の底に選択的に付着する。他方では、タイプIIナノキャビティ(図3(d))のためには、基板38の露出した表面66は、不動態化されて(例えば、PEGシランで)、キャプチャー分子54が基板38の表面66に付着するのを防止することができ、むしろ、キャプチャー分子54がナノキャビティの側壁60に選択的に付着するようにする。または、図3(e)に示すように、キャプチャー分子54がナノキャビティの側壁60へ結合することを促進するために、 $\text{SiO}_2$ の薄い( $\sim 20\text{nm}$ )層68を沈着させて、頂部金属表面64を覆う。この構造によると、唯一の露出基板面は、ナノキャビティの内壁であり、これに対し、キャプチャー分子の選択的誘導化が行なわれる。図3(e)に示されていない、Al又はCrの層(例えば、 $\sim 5\text{nm}$ )は、 $\text{SiO}_2$ 層の付着を促進するために用いることができる。

10

#### 【0034】

ナノキャビティ基板の表面は、また、キャプチャー分子の共有又は非共有固定化のために修飾することもできる。例えば、ナノキャビティ基板の $\text{SiO}_2$ 及び $\text{Si}_3\text{N}_4$ 表面は、また、反応性種、例えば、エポキシシランによって修飾することができる。反応性種による表面修飾化の後に、キャプチャー分子の被覆を行なうことができる。例えば、アミン修飾核酸プローブは、エポキシシラン修飾表面にスポットされることができ、アミン基及びエポキシ基の反応が、アミン修飾核酸プローブを基板の表面に共有結合させる。

20

#### 【0035】

理論に縛られることを望むわけではないが、各金属界面における表面プラズモンモードは、一般に、異なる伝播定数を有するので、通常は、これらのモードの一つのみ(金属-空気界面におけるモード)が、伝達強化に関与する。しかし、2つの界面におけるモードを互いに結合することもできる。蛍光励起強化は、表面プラズモン交差結合によって改良されうる。表面プラズモン交差結合は、金属フィルムと石英基板との間に、オキシ窒化ケイ素( $\text{SiON}$ )の薄層を沈着させることによって、基板における屈折率を制御することによって得ることができる。図1(a)は、金属表面34上に沈着した $\text{SiON}$ 層96を示す。例えば、プラズマ強化化学蒸着によって沈着した $\text{SiON}$ によって、酸素と窒素原子の相対的比率を調節することによって、屈折率を $1.46 \sim 2.05$ の範囲内に連続的に制御することができる。図3(d)に示すようなタイプIIナノキャビティでは、頂部表面上の $\text{SiO}_2$ の限定された厚さの効果は、その界面における表面プラズモン波の伝播定数に考慮されるべきである。

30

#### 【0036】

ナノキャビティの幾何学はさらに、恐らくナノキャビティのアスペクト比 $h/d$ (この場合、 $h$ はナノキャビティの高さ若しくは深さである)に基づいて、ナノキャビティ内のフルオル(fluors)の発光性に強い影響を及ぼす。幾何学的性質、例えば、間隔と入射光の入射角をさらに最適化して、表面プラズモン結合を最大化することができる。

40

#### 【0037】

サンプルは、フローセル又はマイクロ流路を通してハイブリダイゼーション帯アレイにデリバリーすることができる。図4に示すように、ナノキャビティ・アレイ300はマイクロ流路160内に配置する。サンプル流は、シリンジ・ポンプによって適当な流速度、例えば $0.3\text{ml}/\text{分}$ で生じる。標的が流路の内面に結合するのを避けるために、流路の内側表面積を例えばウシ血清アルブミン(BSA)によって不動態化することができる。

50

## 【0038】

金属ナノ構造のサブアレイは、高感度のリアルタイム検出を提供することができる。図1には、3種類の周期的金属ナノ構造を図1に概略的に示す。図1(a)~(c)はナノキャビティの周期的アレイ30、いわゆる“ブルズアイ”構造180及びナノキャビティの改変周期的アレイ(modified periodic array)190を例示する。構造180は、環状波形格子102によって囲まれた単ナノキャビティ100である。幾何学的パラメーターと光路を示す、各ナノ構造に対応する断面も、図1にそれぞれ示す。

## 【0039】

最初の二つのアーキテクチャ(図1(a)と(b))では、ナノキャビティ32は標的実体(target entity)の結合及び検出サイトとして役立ち、第3アーキテクチャ(図1(c))では、ナノ粒子72が結合及び検出サイトとして役立つ。強化された蛍光変換が、優先的に金属ナノキャビティ内に結合した又は金属ナノ粒子に付着した分子の光学的励起によって生じる。

## 【0040】

理論によって縛られるのを望むわけではないが、図1の三つのナノ構造の強化された蛍光は、二つのメカニズム：入射光と表面プラズモンモードとの結合(この場合に、該結合はナノキャビティ・アーキテクチャ内の金属の周期的パターンによって及びナノ粒子の局部プラズモン共鳴の直接励起によって生成される回折格子を介して生じる)と、蛍光収率の増強を生じる、フルオルと金属ナノ構造との相互作用(金属ナノキャビティ内の閉じ込め又は金属ナノ粒子への近接のいずれかによる)を通じて生じる。これらの強化メカニズムは、透明な基板上の直接励起に比較して、蛍光の一桁以上大きい増強を生じる可能性がある。

## 【0041】

個々のナノキャビティは、閉鎖環境(即ち、標的結合)の誘電特性の変化時にスペクトルシフトを受ける可能性がある局在プラズモン共鳴を有し；特定の空間配置に置かれたときに、集団振動(collective oscillations)がより狭い共鳴を生じる可能性がある。ナノキャビティ内の分子結合時に、共鳴ピーク位置の測定可能な変化が得られる可能性がある。共鳴ピークのスペクトル位置は、ナノキャビティの誘電環境に基づいて変化する。慣用的な二色スキャナーを用いて、この無標識マイクロアレイ検出標的分子を得て、分子結合時の反射の共鳴シフトを測定することができる。

## 【0042】

ナノキャビティ・アレイは、シグナル対バックグラウンド比を著しく改良する。したがって、ナノキャビティ・アレイは多くの臨床的、環境的及び産業的用途に大きな使用を見出し、このようにして、標的実体の迅速で、高感度のリアルタイム検出を提供する。

## 【0043】

典型的なリアルタイム・ハイブリダイゼーション・アレイ(一般に平面におけるエバネッセント波励起に基づく)では、プローブ分子がその全体に均一に分散している感知帯面積全体(並びに感知帯アレイ全体)を、励起光が覆う。結合した標的表面积濃度が低い場合に(この濃度が、ハイブリダイゼーション動力学反応の終点が生ずるより十分に前でありうる又は低濃度種の終点でさえありうるときに)、励起光の大部分は消耗される、又は一層悪いことには、エバネッセント場内に存在する溶媒又は非結合種からのバックグラウンド・シグナルを誘発する。理論に縛られることを望むわけではないが、リアルタイム・ハイブリダイゼーション・アレイは、感知帯が金属ナノ構造のサブアレイに基づくものである場合に、この問題を次の二つのメカニズムによって解決する：選択的表面化学によって、標的分子のみが、その周囲で蛍光の励起と発光強化が生じる(総合係数(total factor) $M_{tot}$ によって)ナノ構造に結合する；及びそれ以上ではこれらの強化が生じる充填比率(fill fraction)が100%未満であり、それによってバックグラウンド蛍光の供給源からの単離を可能にする。これらの要素は、共焦点及びニアフィールド方法が単分子蛍光顕微鏡検査において提供する利益とほぼ同じである(W. E. Moerner and D. P. Fromm, "Methods of single- molecule fluorescence spectroscopy and microscopy," Review of

10

20

30

40

50

Scientific Instruments 74, 3597-3619(2003) )、但し、ナノスコピック検出サイトが固定され(そして検出帯内でサブアレイ状に配置される)、問題の分子が、それらが結合する該検出サイトに拡散する場合を除く。

#### 【0044】

金属ナノキャビティのアレイは、臨床診断に用いることができる、この場合には、必要な特定の領域は、特定の感染症の原因である病原菌の同定を迅速に知る能力を改良することである。同定に関して、ウイルス、細菌及び場合によっては真菌類を含めた、複数の病原体のいずれによる感染症からも同様な徴候及び症状が生じうるという臨床的シナリオが存在する。一般的な臨床例は肺炎であり、この場合には10種類までの異なるウイルス及び細菌(例えば、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌等)に関して試験することが望ましいと考えられる。

10

#### 【0045】

複数の微生物が原因でありうる、他の臨床例は敗血症であり、この場合には、病原体(単数又は複数)が血流中で増殖する。現在、病原体同定の主流のテクノロジーは依然として微生物の培養とその後の生化学的手段(細菌に関して)又は抗体による染色(ウイルス又は細菌に関して)による同定である。細菌の培養及び同定は典型的に2日間以上の日数を必要とし、ウイルス培養は1週間から数週間を要する可能性がある。同定時間の短縮に関する有意な進歩は、核酸増幅方法、とりわけポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって達成されている。多くのウイルスと一部の細菌に関して、同定時間は1日間未満に短縮されている。しかし、PCR方法はそれらの現在のフォーマットでは、6~8以上(more than 6~8)の病原体を同時に検出するそれらの能力に関して依然として限定されている。この限定は、マルチプレックスPCRに関連した技術的課題と、オリゴヌクレオチド・プローブに結合しうる、十分にスペクトル的に明確な検出フルオル数の限定によるものである。これに関連して、例えばPCRのような増幅方法を用いて、疑わしい病原体から種々のシグネチャー遺伝子領域(signature genetic regions)をマルチプレックス増幅して、続いて増幅生成物を相補的配列含有アレイにハイブリダイゼーションする、アレイに基づくテクノロジーの利用へのかなりの関心と、これに向けられるかなりの努力が存在する。技術的には魅力的であるが、現在の障害は依然として、バックグラウンドを超える十分なシグナルを得るために必要なハイブリダイゼーション時間の長さであり、大抵のアレイは数時間から一晩までのオーダーのハイブリダイゼーション時間を要する(Y. Y. Belosludtsev, D. Boweman, R. Weil, N. Marthandan, R. Balog, K. Luebke, J. Lawson, S. A. Johnston, C. R. Lyons, K. O'Brien, H. R. Garner, and T. F. Powdrill, "Organism identification using a genome sequence independent universal microarray probe set," Biotechniques 37, 654-660 (2004))。

20

30

#### 【0046】

理想的には、感染症によって、医師はサンプル採集から2時間以内の病原体同定の結果を好むと考えられる。分子診断には3工程:(1)サンプル用意;(2)PCR;及び(3)検出が存在する。サンプル用意は大体15~30分間を要し、PCRは30~60分間で行なうことができる。感染症の場合には、これは検出のために大体30~75分間を残すが、これは現在のハイブリダイゼーション・アレイでは明らかに不可能である。ハイブリダイゼーション帯としてのナノキャビティ・アレイは多重病原体の迅速で、高感度の検出を提供することができる。

40

#### 【0047】

ナノキャビティ・アレイ用途の他の例は、遺伝子発現分析である(H. P. Saluz, J. Iqbal, G. V. Limmon, A. Ruryk, and W. Zhihao, "Fundamentals of DNA-chip/array technology for comparative gene-expression analysis," Current Science 83, 829-833 (2002))。ナノ構造ハイブリダイゼーション・アレイは、それらの増大した感度(リアルタイム分析と大きく改良されたシグナル対バックグラウンド比のために)によって、現在終点方法又は他のリアルタイム方法によって研究することができない、十分に発現されていない遺伝子の検出によって、発現分析における新たな科学的手段を促進することができる

50

。この新たな可能性は最終的には、例えば、調節経路(regulatory pathway)、薬物介入及び腫瘍細胞の生物学的挙動をより良く理解させることができる。他の手段は、RNA集団を直接分析する能力にあり(この場合には線形増幅工程さえ完全に回避されうるか又は最小化されうる)、ネイティブRNAを20~100塩基に切断する消化工程後にRNAの末端標識が行なわれ;切断は拡散の増大によって(via increased diffusion)ハイブリダイゼーション動力学を強化するために行なわれる。

#### 【0048】

アレイ自体の作製コストがコンパクト・ディスクの作製コスト以下でありうるように、低コストのナノ組み立て手法を適用することができる。リアルタイム・アレイ分析のためには、低コストで、使い捨てのマイクロ流路フローセル(microfluidic flow cells)をハイブリダイゼーション・ユニット内のアレイに取り付けることができ、該ハイブリダイゼーション・ユニットは、外部光学的励起及び、結像光学系と低ノイズ電荷結合素子カメラ若しくは他の適当なデバイスとを用いる並行読み出しとコンパクトに一体化することができる。幅広い光線がアレイ全体を覆い、該結合は角度及び波長に比較的鈍感(標準SPRとは対照的に)であるので、励起光の結合は簡単である(SPRバイオセンサーに用いられる方法に匹敵する)。

#### 【0049】

本発明を下記の非限定的実施例でさらに説明するが、これらの実施例は例示のために提供するのであり、如何なる意味でも本発明を限定することを意図するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0050】

##### 1. 金属ナノキャビティ・アレイ内の分子閉じ込めに基づくバイオセンシング

Liu等(Y. Liu, J. Bishop, L. Williams, S. Blair, and J. N. Herron, "Biosensing based upon molecular confinement in metallic nanocavity arrays," Nanotechnology, vol. 15, pp. 1368-1374, 2004)は、金属ナノキャビティ内に置かれた分子の光学的励起によって強化された蛍光変換が生じるアフィニティ・バイオセンサー・プラットフォームの原理を述べている。Liu等の内容は、それらの全体で、この参照によって本明細書に援用される。Liu等のナノキャビティは、直径約200nmであり、周期的若しくはランダムな二次元アレイ状に配置され、ネガティブ電子ブーム・レジストを用いる電子ビーム・リソグラフィによって70nm厚さの金フィルム中に作製される。キャビティ内の分子の蛍光出力を約10の係数で強化するために、周期的配置金属ナノキャビティとランダム配置金属ナノキャビティの両方が使用可能であることが、判明している。さらに、該プラットフォームは、非結合種によって生じる蛍光からの単離を可能にして、リアルタイム検出、例えば、溶液中の20塩基オリゴヌクレオチドのリアルタイム検出にそれを適したものに

#### 【0051】

##### 2. 金属ナノキャビティ・アレイの強化された蛍光変換性質

Liu等(Y. Liu, F. Mahdavi, and S. Blair "Enhanced fluorescence transduction properties of metallic nanocavity arrays," IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics 11, 778-784 (2005))は、金属ナノキャビティ内に結合した分子種の蛍光強化を述べている。Liu等の内容は、それらの全体で、この参照によって本明細書に援用される。Liu等のナノキャビティ構造は、リアルタイム・マイクロアレイの幾つかの望ましい性質、例えば、ナノキャビティ内の励起光の局在、非結合種によって生じた蛍光からの明確な単離(strong isolation)及び結合種の蛍光収率の見かけの増加(apparent increase)を示す。実験的測定は、大体、ナノキャビティ内の励起強度の2係数増加(a factor of two increase)と収率の6係数増加を示す。ナノキャビティ内の双極子の電磁モデルは、推定収率と一致して放射出力の増加を示し、さらにナノキャビティの外側に存在する種からの明確な蛍光単離を実証する。

#### 【0052】

##### 3. 金属ナノキャビティのアレイ中の分子閉じ込めに基づくバイオセンシング

金属ナノキャビティのサブアレイに基づくハイブリダイゼーション・アレイ・プラットフォームを最適化し、有効であると実証するために、下記研究を設計する。これらのナノキャビティ・アレイは、ハイブリダイゼーション動力学のリアルタイム測定を容易にし、大きいハイブリダイゼーション・アレイ・フォーマットに拡大可能であり、臨床セッティングにおける迅速スクリーニングを可能にする、有意に改良された分子感度を有する。

#### 【0053】

リアルタイム・アッセイにおける分子感度を測定するために、溶液中の種が上面に結合するのを避けるために底面（石英）又は金側壁のいずれかでナノキャビティの誘導体化を行なう。それ故、二つのナノキャビティ・アレイ実施態様を、露出石英面又はナノキャビティ側壁のいずれかの選択的誘導体化に関して試験する。最初の実施態様（タイプⅠ）は、図3（c）に概略的に示す。これらのサンプルは、m P E G - チオールで不動態化する。第2実施態様（タイプⅡ）は図3（d）に示す、これはS i O<sub>2</sub>の薄い（～20nm）オーバーコートから成る。S i O<sub>2</sub>の付着を促進するためにA l又はC rの～5nm層を用いる。この構造によると、唯一の露出金表面が、選択的誘導体化が行なわれる、ナノキャビティの内壁である。

#### 【0054】

以前の研究が、ナノキャビティ・アレイに付随した二つの蛍光強化効果：収率強化と表面プラズモン励起強化を同定した。これらの強化を、強化係数の間接的及び直接的測定を可能にする二つの実施態様：底部に置かれた分子による強化（タイプⅠ）と、側壁に置かれた分子による強化（タイプⅡ）を用いて、さらに詳細に研究する。該強化係数タイプⅠ及びⅡ実施態様に対する付加的表示 $M^{b o t t o m}$ 及び $M^{s i d e}$ を有するは、それぞれの表面積 $A^{b o t t o m} = d^2 / 4$ 及び $A^{s i d e} = 2 d h$ （式中、 $d$ と $h$ はそれぞれナノキャビティの直径と高さである）に基づいて算出される。 $h > d / 2$ である場合には、側壁の表面積は底部の表面積よりも大きい。 $M^{b o t t o m}_{c a v}$ 及び $M^{s i d e}_{c a v}$ によって与えられ、蛍光収率の増大を生じる、ランダム・アレイにおけるキャビティ強化蛍光に関連した強化係数が決定される。 $M^{b o t t o m}_{s p}$ 及び $M^{s i d e}_{s p}$ によって与えられる、周期的アレイにおける蛍光の表面プラズモン励起強化も決定される。

#### 【0055】

75  $\mu$ m × 75  $\mu$ mサイズである、個々の検出帯を構築して、ナノキャビティ強化を特徴付け、表面プラズモン励起強化を最適化する。これらの帯を、リアルタイム・アッセイにおける分子感度の試験のために3 × 3アレイ状に配置する。電子ビーム・リソグラフィの他の適当な手法を用いて、個々の検出帯を組み立てることができる。使用可能である、他の構築手法は、ナノインプリント・リソグラフィであり（S. Y. Chou, P. R. Krauss, and P. J. Renstrom, "Nanoimprint lithography," Journal of Vacuum Science & Technology B 14, 4129- 4133 (2004)）、この手法では、電子ビーム又は集束イオンビームリソグラフィを用いて、任意のパターンをマスター上を書くことができ、その後、該マスターを用いて、多重コピーをスタンプアウトする（基本的には誘電層によって囲まれた薄い金属層であるC D及びD V Dのために用いられる方法と同様に）。

#### 【0056】

##### 3. 1 ナノキャビティ強化の特徴付け

金属ナノキャビティ内の分子閉じ込めによって生じる蛍光収率の強化を特徴付けて、キャビティ強化の大部分が蛍光収集効率の増大に起因することを実証するために、誘導体化ナノキャビティの詳細な特徴付けを行なう。

#### 【0057】

##### ナノキャビティ誘導体化方法の開発と特徴付け

2種類の異なる不動態化方法を、ナノキャビティの選択的誘導体化のために用いて、ナノキャビティに対して標識アビジン単層を形成する。タイプⅠ実施態様のためには、単層形成がナノキャビティの底部においてのみ生じるように、m P E G - チオールを用いる金表面の不動態化を参考文献に従って行なう（K. L. Prime and G. M. Whitesides, "Adsorp

10

20

30

40

50



tion of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers," Journal of the American Chemical Society 115, 10714-10721 (1993)). タイプ I I 実施態様 (即ち、 $\text{SiO}_2$  オーバーコートによる) のために、誘電性表面を不動態化して、それによって露出金側壁上にのみ単層形成を可能にする、同様な方法が開発されている。タイプ I I では、誘電性表面不動態化を m P E G - シランを用いて行なう。次に、標識アビジン溶液の導入が露出金表面上の単層形成を可能にする。該側壁を選択的に誘導体化する代替方法を用いることもできる、この方法は、金表面に強く結合するピオチニル化チオールによって開発された方法 (D. M. Disley, D. C. Cullen, H. X. You, and C. R. Lowe, "Covalent coupling of immunoglobulin G to self assembled monolayers as a method for immobilizing the interfacial -recognition layer of a surface Plasmon resonance immunosensor," Biosensors and Bioelectronics 13, 1213-1225 (1998)) に従う。次に、C y - 5 標識ニュートラアビジンを単層のために用いる、この場合に、該ニュートラアビジンは誘電性表面とは電荷 - 電荷相互作用を受けないが、ピオチン層とは、そのピオチン結合サイトの二つを介して強く相互作用する。この方法を二つの基準表面：誘導体化後に測定可能な蛍光を当然示さない石英表面と、強い蛍光を当然示す金表面によって試験する。初期のアビジン標識工程中には、平均して、標識アビジンにつき 1 未満の C y - 5 分子が存在する。このことは、蛍光収率のキャピティ強化の説明を複雑にすると考えられる、単アビジン分子上にクラスター状の C y - 5 分子群間の、エネルギー転移の如何なる影響も回避する。次に、標識アビジン溶液を、純粋な  $1 \mu\text{M}$  アビジンを用いて、最終濃度にまで希釈する。

#### 【0058】

以前の研究は、石英基準表面上で行なわれる金不動態化方法が、不動態化工程なしの石英対照表面に比較して、アビジン表面濃度の低下をもたらすことを示唆する。基準サンプルを総蛍光発光と、アビジン (C y - 5) 表面濃度に直接比例する、 $280 \text{ nm}$  ( $650 \text{ nm}$ ) における消光 (extinction) を比較するための偏光解析法試験とに關してさらに特徴付ける。表面濃度が基準と対照とでは異なる場合には、偏光解析法又は X P S 測定によって検出される可能性がある、残留 m P E G - チオール (石英基準表面上) 又は残留 m P E G - シラン (金基準表面上) を基準表面が含有すると思われる。所望の表面上の表面濃度低下は不動態化処理の不可避な結果であると考えられる。

#### 【0059】

これらの不動態化方法はナノスケール容積中へ及びからの質量移動を含めた多重の工程を必要とするので、最終の誘導体化表面を完全に特徴付けることが重要である。この特徴付け研究の裏にある一つの刺激要因 (motivating factor) は、標準の X P S 又は偏光解析法を用いては行なうことができない、ナノキャピティ内の結合アビジン表面濃度の測定である。特徴付けは 2 方法によって、最初は、毛管効果が質量移動に無視できる役割を果たすような、低いアスペクト比  $h/d \sim 0.1$  を用いて行なわれる。各特徴付け工程に成功した後に、ナノキャピティを上首尾に誘導体化するという目的で、アスペクト比を  $h/d > 1$  で高める。最初の特徴付け方法は、単層に対して放射性標識アビジン ( $^{125}\text{I}$  による) を用いる。標識方法は Enzymobeads (Bio-Rad Labs) を用いる。標識の前に、アジ化ナトリウムはラクトペルオキシダーゼの強力な阻害剤であるので、アビジン溶液から Sephadex G-25 (Pharmacia) を用いてアジ化ナトリウムを除去する。Enzymobead 反応器 (reaction vial) に下記試薬を加える：(1)  $0.2 \text{ M}$  リン酸塩バッファー ( $\text{pH } 7.2$ )  $50 \mu\text{l}$ ；(2) アビジン溶液  $500 \mu\text{l}$ ；(3)  $\text{Na}^{125}\text{I}$   $1 \text{ mCi}$ ；(4)  $2\%$  グルコース  $25 \mu\text{l}$ 。この混合物を室温において 40 分間反応させる。未反応  $\text{Na}^{125}\text{I}$  をゲル濾過 (Sephadex G-25) によって除去する。キャリアーとしての B S A の存在下で  $20\%$  トリクロロ酢酸 (T C A) によって標識タンパク質を沈殿させることによって、放射性標識効率 (R E) を測定し、下記式を用いて算出する：

$$\text{R E} = (\text{C P M}_{\text{s o l u t i o n}} - \text{C P M}_{\text{s u p e r}}) / \text{C P M}_{\text{s o l u t i o n}}$$

(1)

[式中、 $\text{C P M}_{\text{s o l u t i o n}}$  は、T C A 沈殿が生じる前の標識タンパク質溶液  $5 \mu\text{l}$

中のカウント数であり、 $CPM_{super}$  は、上清  $5 \mu l$  中のカウント数である]。Beckman Model 170M液体シンチレーション・カウンターを用いて、サンプルをカウントする。次に、 $278 nm$ におけるUV可視分光光度計から測定されるタンパク質濃度のさらなる情報によって、ヨウ化タンパク質の比放射能を算出する。上述した方法と同じ方法によって、放射性標識アビジン単層を形成する。次に、ラジオアッセイを用いて、固定化したアビジンの表面濃度を測定する。サンプルを1分間カウントして、下記式から該表面濃度を算出する：

$$= (CPM / SA) / A_{surf} \quad (2)$$

[式中、 $CPM$ はカウント/分であり、 $SA$ は比放射能であり、 $A_{surf}$ は有効表面積であり、これは丁度ナノキャビティの総面積である]。ナノキャビティ・アレイ・サンプルからの表面濃度を、同じ表面修飾工程を受けている基準サンプルと比較する。第2特徴付け方法は、約 $2 nm$ サイズである金属ナノキャビティと共に標識したアビジンを用いることを必要とする。金属ナノ粒子とのコンジュゲート化は、走査電子顕微鏡イメージング下でコントラストを与えて、ナノキャビティ内でのアビジン単層局在と均一性を直接測定して、基準サンプルと比較することを可能にする。金ナノ粒子・アビジン・コンジュゲートは商業的に入手可能である。高分解能( $\sim 2 nm$ )電界・放出SEMをこれらの測定のために用いる。

#### 【0060】

ナノキャビティ内の表面濃度が基準サンプル( $h/d = 1$ として生じうる)の表面濃度ほどの高さでない状況では、誘導体化方法のパラメーターを調節する。例えば、起こりうる一つの問題は、不動態化後の洗浄工程がナノキャビティの容積を完全にはクリアにすることができず、このことがアビジン単層形成を妨害しうることである。これを解決するための可能な方法は、該洗浄工程の持続時間を長くすること及び/又は該洗浄工程を高温において行なうことである。生じうる他の問題は、ナノキャビティの幾つかの内部に捕捉されて、表面修飾を妨害する気泡の問題である。これが生じる場合には、誘導体化前のナノキャビティの濡れ(wetting)を助成するために、枝付きフラスコ内のバッファー溶液中のサンプルを脱気する。

#### 【0061】

再現性の研究 多重サンプルを通しての強化係数の再現性を知るために、一連の測定を行なう。各実施態様(タイプIとタイプII)の20個の異なるサンプルに関して、エッチング方法を用いて構築された5周期的アレイ・サンプルと5ランダムアレイ・サンプル、及びリフト・オフ方法を用いて構築された、各パターンの5サンプルに関して測定を行なう。ナノキャビティ・サイズは $150 nm$ 直径であり、 $1 \mu m$ 間隔を有し、蛍光出力を被覆石英基板に相対的に測定する。これらの測定からの標準偏差  $ref$ は、パターン構築、単層コーティング、及び光学的アラインメントと検出における変化を反映する。以下に述べる、その後の測定の標準偏差と組み合わせると( $meas$ )、例えば強化係数のような測定される量の変化を統計的に有意と見なすことができるか否かを知ることができる。金属エッチングに基づくナノ組み立て方法を用いて、我々は、 $d = 200 nm$ で、周期的及びランダムアレイに関して、それぞれ、7%以下及び11%以下の  $ref$ を得た。該偏差は $d = 150 nm$ ではより大きくなるが、新たなリフト・オフ方法によると、同じ $d$ に対するエッチング方法に比べて  $ref$ を減ずることが期待される。その後の研究のために、最小の偏差を生じる方法に基づいて、ナノ組み立て方法を選択する。

#### 【0062】

ナノキャビティによる蛍光収率強化 表面プラズモン励起強化が抑制される場合に、ナノキャビティのランダム配置を用いることによって、金属ナノキャビティ内の分子閉じ込めによる蛍光収率強化の起源を知るために下記方法を設計する。蛍光収率の正味の増加は、係数  $M_{cav} = M_{rad} \cdot M_{coll}$  [式中、 $M_{cav}$ はランダムアレイからの蛍光強化係数であり、 $M_{rad}$ は放射率(radiative rate)の増加によるものであり、 $M_{coll}$ は蛍光収集効率の増加に由来する]によって与えられる。ランダム・ナノキャビティ配置を用いた以前の研究は、 $M_{cav}$ が $120 nm$ 直径キャビティに対する約10から $200 nm$ 直径に対する約7までであり、 $150 nm$ に対して予測ピークを有することを示した

。この観察は、ナノキャビティ幾何学が、恐らくはナノキャビティ・アスペクト比  $h/d$  ( $h$  は高さである) に基づいて、フルオルの発光特性に対して強い影響を及ぼすことを示唆する。この影響を、 $50 \sim 250 \text{ nm}$  直径の範囲のナノキャビティ直径を用いて、そしてシミュレーションからの結果と比較することによって、実験的に研究する。

#### 【0063】

ナノキャビティによる総蛍光強化係数をタイプ I とタイプ II の両実施態様に関して、基準サンプルに相対的にランダム・ナノキャビティ配置からの光出力を測定することによって算出して、 $M_{cav}$  を得る。これらの測定は、入射光によるナノキャビティ内のフルオルの直接励起に基づく。収集効率係数 (collection efficiency factor)  $M_{col}$  は直接測定することが困難であるので、その代わりに、 $M_{cav}$  と  $M_{rad}$  の測定から間接的に算出する。放射率の調節 (modification) による蛍光収率強化を推定するために、直接蛍光寿命測定を時間相関単フォトンカウンティング系によって行なう、この場合には、一度に単一ナノキャビティをイメージングする代わりに、約  $16 \mu\text{m}$  スポットサイズを励起させて、イメージングする。このことは実験を行ない易くし、ランダム・ナノキャビティアレイを用いることの一つの理由である。この方法によって、該寿命を、底部上の分子 (タイプ I 実施態様、 $M_{bottomrad}$  を得る) 及び側壁上の分子 (タイプ II 実施態様、 $M_{siderad}$  を得る) に関して測定することができる。側壁上のフルオルに関して、フルオル～金属分離 (the fluor to metal separation) が 1 アビジン分子の厚さ (約  $5 \text{ nm}$ ) であり、底部上のフルオルに関しては、平均分離は  $d/6 > 15 \text{ nm}$  である。ナノ粒子による実験 (A. Wokaun, H.-P. Lutz, A. P. King, U. P. Wild, and R. R. Ernst, "Energy transfer in surface enhanced luminescence," Journal of Chemical Physics 79, 509-514 (1983); J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz "Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dye- labeled oligonucleotides," Analytical Biochemistry 315, 57-66 (2003)) は、最大蛍光強化が、約  $9 \text{ nm}$  のフルオル～金属分離に対する放射率の増大によるものであることを示唆する。主として収集効率の増大のために、アスペクト比  $h/d = 100/150 = 0.67$  で正味キャビティ強化が最大になると予想される。これらの測定は、ナノ組み立てと誘導体化の空間的制限を考慮して得ることができる最大の強化係数を同定することができる。各実施態様に関して、実験的導出  $M_{col}$  を実証するために、分子双極子の放射特性 (radiative properties) (あらゆる分極配向を用いる) の綿密な電磁的シミュレーション (FEMLAB、商業的な有限要素法微分方程式ソルバーを用いる) を金属ナノキャビティ内の種々な位置において行なう。例えば、タイプ II 実施態様に関して、双極子をナノキャビティの側壁に沿って金属表面から  $5 \text{ nm}$  の間隔をおいて配置する。該ナノキャビティからの総放射出力を、石英表面上の同じ双極子によって生じる出力と比較して、 $M_{col}$  を推定する。次に、平均放射線強化を、3 直交双極子配向とナノキャビティの底部に沿って (タイプ I) 又は側壁に沿って (タイプ II) 分布した双極子位置とに関して得られた  $M_{col}$  値に基づいて算出する。

#### 【0064】

これらの測定の重要性は：(1) キャビティ強化による収率の最大増加が生じるナノキャビティの空間的領域 (即ち、タイプ I 又はタイプ II 実施態様) を同定するため、(2) 放射率強化と収集効率強化による正味収率への寄与を測定するため、及び (3) ナノキャビティ・アスペクト比 (この場合、 $h/d = 0.67$  が  $> 10$  で最適であると思われる) の実際の制限を考慮して最大正味収率を測定するために、三倍である。特定のフルオルに対する正味キャビティ強化は、励起強度に無関係であり、終点検出方法に関して行なわれるように、石英基板上で行なわれる検出にわたってフォトブリーチング制限変換感度強化を定める。該研究のこの部分は、この後の研究に適用されるナノキャビティ幾何学 (直径  $d$  及び高さ  $h$  の数値に関して) を決定する。

#### 【0065】

### 3.2 表面プラズモン励起強化の最適化

タイプ I とタイプ II 実施態様を用いて、周期的アレイにおいて表面プラズモン結合に

よる蛍光励起強化  $M_{s_p}$  を最適化するように、下記方法を設計する。以前の研究は、該 2 実施態様に関する表面プラズモン強化係数がほぼ均一である（即ち、 $M^{b o t t o m}_{s_p} \sim M^{s i d e}_{s_p}$ ）ことを示唆する。

#### 【0066】

総蛍光強化係数 ( $M_{t o t}$ ) は、基準表面に対する周期的アレイからの標準化蛍光出力の比率によって算出され、表面プラズモン励起強化係数  $M_{s_p}$  は、同じナノキャビティ直径  $d$  と平均間隔  $\Lambda$  の、周期的アレイとランダムアレイとの蛍光の比率によって与えられる。これらの数量から、蛍光収率の見かけの増加を、本明細書で前述したように、比率  $M_{c a v} = M_{t o t} / M_{s_p}$  から算出することができる。

#### 【0067】

以前の研究は、表面プラズモン結合による強度強化係数  $M_{s_p}$  が約 2 の係数であるが、幾何学的パラメータの最適化によって、この係数は 7 若しくはそれ以上に増加しうると期待される (H. J. Lezec and T. Thio, "Diffracted evanescent wave model for enhanced and suppressed optical transmission through subwavelength hole arrays," *Optics Express* 12, 3629-3651 (2004))。ナノキャビティ内での励起強化の原因は、強化された伝達の条件 (Y. Liu and S. Blair, "Fluorescence enhancement from an array of sub-wavelength metal apertures," *Optics Letters* 28, 507-509 (2003)) 下で、エネルギーがナノキャビティ内に集中するという事実から生じる。ナノキャビティの周期性は自由空間からの入射光が表面プラズモンモード中へ結合するのを支持するのみでなく、ナノキャビティ内の建設的干渉を生じる、ナノキャビティ壁からのコヒーレント散乱によって、表面プラズモンの伝播特性をも修飾する (modify) (I. I. Smolyaninov, W. Atia, and C. C. Davis, "Near-field optical microscopy of two-dimensional photonic and plasmonics crystals," *Physical Review B* 59, 2454-2460 (1999))。これらの研究では、固定化フルオルが、ナノキャビティ内の光学強度増強に局部プローブとして作用する。金属ナノキャビティ側壁の表面粗さは、ナノ規模の粗さは“ライトニング-ロッド”効果を介して光強度増強の終点として役立ちうるので、表面プラズモン励起強化の測定に關与する (A. V. Ermushev, B. V. Mchedlishvili, V. A. Oleinikov, and A. V. Petukhov, "Surface enhancement of local optical fields and the lightning-rod effect," *Quantum Electronics* 23, 435-440 (1993))。表面粗さの規模はナノキャビティのサイズ未満であるので、如何なる発現 (manifestation) も 1 つのナノキャビティを横切って平均化すべきである。この効果は、タイプ I 実施態様（タイプ II 実施態様は同じになる筈である）に関してナノキャビティ内の表面粗さを推定し、これらの推定値をナノキャビティ・アレイを通しての光伝播の数値モデルに組み入れることによって間接的に数量化すべきである。FEMLAB による数値モデル化を用いて、励起強化のナノキャビティ・アレイ幾何学的係数を最適化し、測定された強化係数に対する側壁粗さの影響を特徴付けることに役立てることができる。短軸が 50 ~ 250 nm の範囲内であるが、長軸はダイシングとポリシング (dicing and polishing) をより信頼できるものにするほどの数  $\mu m$  長さであるような、厳密に楕円形であるナノキャビティの断面分析によって、表面粗さを実験的に推定すべきである。高分解能 SEM を、約 2 nm の分解能による断面検査に用いることができる。

#### 【0068】

表面プラズモン結合による励起強化 ナノキャビティ側壁上のフルオルによる蛍光強化  $M^{s i d e}_{s_p}$  とナノキャビティ底部上のフルオルによる蛍光強化  $M^{b o t t o m}_{s_p}$  を測定して、相対的励起効率を知るために、下記方法を設計する。各実施態様に関して、基準サンプルに相対的に蛍光強化を、約 600 nm ~ 約 1  $\mu m$  の範囲である、平均ナノキャビティ間隔  $\Lambda$  の異なる値のランダムアレイ及び周期的アレイに関して測定する。これらの測定は入射角の関数として行なう、この場合にピーク蛍光は、表面プラズモン結合のために入射光のピーク伝達の角度に対応する。

#### 【0069】

入射角は  $x$  軸に沿ってのみ変化するので、該水平軸との結合曲線の交差がピーク伝達（及びピーク蛍光）の角度に一致する。これらの測定から、 $\theta$  及び入射角  $\theta_i$  に対する各実施

10

20

30

40

50

態様の $M_{sp}$ の二次元データセットが得られ、これからピーク蛍光の値を取り出すことができる。最大値が何処で生じるかを予測することができる。一般に、蛍光強化は  $\lambda$  が減少すると増大する筈である。さらに、二つ以上の結合順序のオーバーラップによって、蛍光強化の増加が生じることになる  $\lambda$  の個々の値が存在する。例えば、 $\lambda = 1 \mu m$  と  $678 nm$  の状況を比較すると、 $25^\circ$  における  $\lambda = 1 \mu m$  に関するよりも  $27^\circ$  における  $\lambda = 678 nm$  に関するほうが大きい強化が得られると期待される。この理由は、より小さな間隔では、 $27^\circ$  での結合が二つのオーバーラッピング回折順序に相当する（設計によって）ので、二つの表面プラズモン波が励起され、それによって各ナノキャビティ内の強度を平均して高めるからである。

#### 【0070】

交差結合(cross-coupling)を用いる表面プラズモン強化の最適化 金属界面の各々における表面プラズモンモードは一般に、異なる伝播定数を有するので、これらのモードの一つのみ（金属 - 空気界面におけるモード）が強化された伝達に参与する。しかし、2界面におけるモードは一緒に結合する（又は交差結合する(R. W. Gruhlke, W. R. Holland, and D. G. Hall, "Surface-plasmon cross coupling in molecular fluorescence near a corrugated thin metal film," Physical Review Letters 56, 2838-2841 (1986); R. W. Gruhlke, W. R. Holland, and D. G. Hall, "Optical emission from coupled surface plasmons," Optics Letters 12, 364-366 (1987)）ことが可能であり、この場合には、周期的格子のモーメントが二つのモードのモーメントの差に適合する：

$$= 2 / \lambda = |k_{sp,1} - k_{sp,2}| \quad (3)$$

この条件下では、両界面が伝達強化に参与して、蛍光強化が改良されうると期待される。特定の励起波長（例えば、 $633 nm$ ）に関して、交差結合が生じる  $\lambda$  の一つのみが存在し、これは第1実施態様では約  $1150 nm$  である。しかし、二つの界面における誘電体の屈折率の差が増大するにつれて、 $\lambda$  の必要な値は低下する。 $\lambda = 678 nm$  では、基板側上の必要な屈折率は  $1.513$  である。金と石英基板との間にオキシ窒化ケイ素（SiON）の薄フィルムを付着させて基板における屈折率を調節することによって、表面プラズモン交差結合を達成することができる。プラズマ強化化学蒸着によって付着した SiON によると酸素原子と窒素原子の相対的比率を調節することによって、 $1.46 \sim 2.05$  の範囲内の屈折率にわたって連続制御することができる。同様の設計が第2実施態様においても試験され、ここにおいて、該界面における表面プラズモン波の伝播定数には、上面における SiO<sub>2</sub> の有限厚さの効果を考慮しなければならない。

#### 【0071】

励起強化のこれらの最適化（ナノキャビティ強化の特徴付けと共に）の重要性は：（1）最大総蛍光強化（即ち、 $M_{tot} = M_{sp} \cdot M_{cav}$ 、この場合、 $60$  以上が期待される）を有する実施態様（タイプ I 又はタイプ II）を知るため、及び（2） $M_{sp}$  を最大化する幾何学的及び屈折率特性を知るために二倍である。最適の実施態様と幾何学的パラメータは、リアルタイム・アッセイにおける分子感度の研究に進展される。

#### 【0072】

これまでは、これらの研究は、スキャンニング又はイメージングによる終点読み出しによって得られた感度に直接比較可能であり、各ハイブリダイゼーション帯での同じ入射出力に対して、ナノキャビティ・アレイを含むハイブリダイゼーション帯は  $M_{tot} > 12$  の係数による強化された蛍光を提供する。このことは、帯当たり  $\sim 1 / M_{tot}$  弱 ( $\sim 1 / M_{tot}$ , fewer) の結合分子を検出できることを意味し、大体  $1 / M_{tot}$  時間内にハイブリダイゼーションが行なわれうることを暗示する。しかし、ハイブリダイゼーション動力学の直接の測定を可能にするリアルタイム検出アプローチ方向に進むことによって、有意な利益を得ることができるので、これは話の一部に過ぎない。これらの利益には、溶液中の標的濃度の定量測定（これは終点分析では非常に困難である）、非特異的結合とヘテロ二本鎖に対する識別、及び結果を得るための短い時間が包含される。リアルタイム検出を行なうために、非結合種によって生じる蛍光からの明確な単離がなければならない。下記に示すように、金属ナノキャビティ・アレイは他の表面選択的手法よりも大きい単離（ $10$

の係数よりも大きく)を可能にし、このことが既述した蛍光強化と共に、この手法をDNAに基づく臨床診断に非常に適したものにする。

#### 【0073】

#### 3.3 リアルタイム・アッセイにおける分子感度の測定

リアルタイム・アッセイにおける分子感度を測定するために、リアルタイム・核酸ハイブリダイゼーション測定を、 $3 \times 3$ アレイのハイブリダイゼーション帯によって行なう。金属ナノキャビティ・アレイが非結合種から明確な蛍光単離を1/(如何なるウォッシュレスアッセイ(washless assay)においても重要な考慮すべき事項である)に比例して生じることを実証し、そして非特異的結合が問題になりうる状況においても、アッセイ時間を標的濃度の関数として測定する。臨床診断に関連した実証研究は、多重の標的種と対照を用いて行なう。 $3 \times 3$ アレイを同時にイメージングするために、低ノイズ冷却CCDカメラを用いて、第2実験設計を構築する。ナノキャビティ・アレイ実施態様(即ち、タイプI又はタイプII)と、前述した研究から分かるような、最大蛍光強化を生じる幾何学的パラメーターを用いる。開放ウェルと共にフレキシブルなマイクロ機械加工ガセットを用いて、手動スポッティングを行いうるほど相互から十分な間隔(約1mm)を置いて、一つの帯を他の帯から単離させて、ハイブリダイゼーション帯を配置する。T3ポリメラーゼ・プロモーター・サイトをモデル系として用いる; T3 5'-(AATT AACCTC ACT AA AGGG)-3'と相補的抗T3は、商業的に入手可能であり、Cy-5によって蛍光標識することができる。該実証研究に合成60塩基長も用いられる。蛍光標識した標的種と非標的種を含むサンプル溶液を、ナノキャビティ・サンプルの上面に存在するフローセルを用いて、該表面に導入する(Y. Liu, J. Bishop, L. Williams, S. Blair, and J. N. Herron, "Biosensing based upon molecular confinement in metallic nanocavity arrays," Nanotechnology 15, 1368- 1374 (2004)) (図4参照)。

10

20

30

40

50

#### 【0074】

抗T3プローブによるナノキャビティ誘導体化 ナノキャビティ内のキャプチャー・オリゴヌクレオチド(これらの研究のための抗T3)の固定化を特徴付けるために、下記方法を設計する。アビジン単層の形成に続いて、アビジン被覆表面の上部で自己組織化する $0.15 \mu\text{M}$  5'-ビオチニル化抗T3の溶液を形成する(J. N. Herron, S. zumBrunnen, J.-X. Wang, X.-L. Gao, H.-K. Wang, A. H. Terry, and D. A. Christensen, "Planar waveguide biosensors for nucleic acid hybridization reactions," Proceedings SPIE 3913, 177-184 (2000))。誘導体化方法を、放射性標識した抗T3を用いてプローブ表面濃度を測定するように特徴付けて、該方法を最適化する。再現性のために、これらの方法を $3 \times 3$ アレイの9帯全てにおいて同じように実施する。

#### 【0075】

( $^{32}\text{P}$ )ホスフェートで末端標識することによって、放射性標識オリゴヌクレオチドを作製する。固定化キャプチャー・オリゴ(即ち、抗T3)の表面濃度を測定するために、5'-ビオチニル化オリゴを、末端トランスフェラーゼを用いて、( $^{32}\text{P}$ )ATPで標識する。この酵素は該オリゴの3'末端に( $^{32}\text{P}$ )AMPを加える。商業的な3'末端標識キット(Perkin Elmer)を用いて、反応を行なう。付加的なアデノシン基(extra adenosine group)は、固定化アビジン単層への該標識オリゴの結合を妨害しないと期待される。式(1)によって前記と同じ方法を用いて、放射性標識効率を算出する。オリゴ濃度を、 $260 \text{ nm}$ においてUV-vis分光光度計を用いて測定する。アビジン単層上の放射性標識した抗T3の自己組織化後に、プローブ表面濃度を、放射性同位体デテクターを用いて、式(2)によって算出する。ナノキャビティ・アレイ内の表面濃度を平面基準サンプルに関して得られた表面濃度と比較する。ナノキャビティの誘導体化方法は、この比較の結果として調整される必要がありうる;例えばナノキャビティ表面濃度のほうが低い場合には、自己組織化工程の前に溶液中の抗T3濃度を $0.15 \mu\text{M}$ から高める必要がある。リアルタイム・ハイブリダイゼーション実験を行なう前に、結合表面濃度と蛍光強度との間のキャリブレーションを行なう。放射性標識を用いて、結合プローブ濃度を知ることができる。次に、Cy-5 3'末端標識抗T3(UV-vis吸収によって決

定された標識比率で)によって同じ表面修飾方法を行なって、測定された蛍光強度と結合濃度とを直接関係づけることができる。この関係を2区画モデルと共に用いて、結合標的分子数に関する検出限界を測定して、プローブ濃度を最適化することができる。

#### 【0076】

シグナル対バックグラウンド比率の測定 非結合種からの蛍光単離を実証して、非特異的結合を考慮した検出感度を知るために、下記方法を設計する。検出可能な蛍光は、ナノキャビティ内からのみ生ずることができるので、非標的分子からの蛍光のランダムな変化は、このような分子がナノキャビティ中へ及びナノキャビティからランダムに拡散する場合にのみ生じる(若干の部分が非特異的結合によるシグナルを生じうるとしても)。ナノキャビティ表面積は、総帯面積の一部(〜2-10%)を表すので、非結合種からのバックグラウンド・シグナルは、例えば平面導波管又は感知表面が帯面積の100%を表す蛍光-SPRのような、他のウォッシュレス表面選択的蛍光センサーにおけるよりも約1/(〜10-50)の係数によって低いことになる。この場合も、これらの研究は、全ての帯が抗T3プローブによって誘導体化される3×3アレイによって行なう。

#### 【0077】

ナノキャビティ・アーキテクチャ内の変換面積は非常に小さいので、標的分子の感知領域中への拡散は、変換面積が感知面積の100%である場合よりもやや緩慢である。次に、第1工程は、標識標的のハイブリダイゼーション動力学を溶液中の標的濃度の関数として、平面導波管に比較して、研究することである。Cy-5色素によって5'末端において標識した標的オリゴ(T3)を、濃度 $C_n$ を有する溶液中に用意する、この場合nは試行回数である。典型的なモル濃度は $10^{-8} \sim 10^{-12}$ の範囲である。フローセル中に導入すると、T3はキャプチャー単層上のプローブ・オリゴにハイブリダイズして、二本鎖DNAを形成する。ハイブリダイゼーション動力学曲線74を各 $C_n$ に関して、各ナノキャビティ内の光強度によって励起された蛍光の時間依存性によって測定する(図5に示すように)。大きく異なる充填比率を有する、二つのナノキャビティ・アーキテクチャと導波管との動力学曲線を比較することによって、拡散時間の増加は以下で定義するようなパラメーター $k_M$ によって推定することができる。さらに、固定化プローブ濃度の最適化は、結合率(binding rate)を最大にすることによって行なわれる。

#### 【0078】

2区画モデルを用いて、該動力学曲線を分析することができる(D. G. Myszkka, X. He, M. Dembo, T. A. Morton, and B. Goldstein, "Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data," Biophysical Journal 75, 583-594 (1998)):

$$dC(t)/dt = 1/h_i \{ -k_a C(t) (R - B(t)) + k_d B(t) + k_M (C - C(t)) \} \quad (4)$$

$$dB(t)/dt = k_a C(t) (R - B(t)) - k_d B(t) \quad (5)$$

式中、 $h_i$ は、有意な標的消耗が起こりうる下部区画の高さであり、 $k_a$ は結合率(association rate)であり、 $k_d$ は解離率(室温における特異的結合に関しては典型的に無視することができる)であり、 $k_M$ は上部区画から下部区画への質量移動を説明し、 $C(t)$ は下部区画中の標的濃度であり、 $R_T$ はプローブ濃度であり、 $C_T$ は上部区画中の標的濃度である(これはフローセルからの注入のために一定であると見なされる)。これらのパラメーターは、種462を同定するためのキャプチャー分子454を有するナノキャビティ432を示す図6に例示される。2区画モデルを用いる目的は、適合定数(fitting constant)  $k_M$ によって、検出サイトのまばらなアレイ(sparse array)への質量移動の効果を算出して、充填比率が100%である平面導波管感知モダリティ(planar waveguide sensing modality)と比較することができることである。非特異的結合の効果を識別するために、該2区画モデルを結合定数 $k_{a1}$ と $k_{a2}$ による表面への2種類の種の結合を表すように改変する。この場合に、二つの結合濃度 $B_1(t)$ と $B_2(t)$ が得られ、有効結合サイトの密度は $R_T - B_1(t) - B_2(t)$ によって与えられる。非特異的種の解離の効果を組み込まなければならないことも考えられる。臨床診断のための最終目的は、2

区画モデルを用いて、各ハイブリダイゼーション帯における動力学の曲線を分析して、溶液中の所望の標的に未知濃度  $C_T$  を知ることである。

#### 【0079】

次の工程は、 $T_3$  / 抗  $T_3$  と同じ長さの第2標識配列を用いて、動力学の測定を行なって、非特異的結合 (NSB) の2区画モデルにおける動力学の係数 (kinetic coefficient) を知ることである。これらの“バックグラウンド・オリゴ”の配列は、標的又はプローブ分子のいずれにも特異的に結合しないように選択する。これらのバックグラウンド・オリゴは、ナノキャビティ中に拡散して、結合種によって得られる動力学の曲線を遮蔽する可能性があるランダム・バックグラウンド・シグナルを生じ、そしてさらに非特異的に結合して (但し、異なる率及び平衡値で)、標的種の動力学を模倣するシグナルを生じる可能性がある (H. Dai, M. Meyer, S. Stepaniants, M. Ziman, and R. Stooughton, "Use of hybridization kinetics for differentiating specific from non-specific binding to oligonucleotide microarrays," *Nucleic Acids Research* 30, (2002))。NSBはある一定の実験条件 (例えば、低いイオン強度) 下で非標的種と、中性 pH において正味の正電荷を有する固定化アビジンとの間で起こりうる。これらの測定は、 $10^{-6} \sim 10^{-10}$  の範囲内の大きい濃度が用いられる場合に  $C_n$  の関数として行なわれる。この場合に、結合 (即ち、binding) 曲線 76 及び解離曲線 78 の両方が、図7に例示するように、それぞれ得られる。解離曲線 78 は一般に、バッファー溶液をフローセルに通して流し、非特異的結合の  $k_d$  の決定を可能にすることによって作製される。動力学の係数 (非特異的種の濃度全体にわたって比較的一定であるべきである  $k_a$  と  $k_d$ ) の決定から、次に、改変二重率 (modified dual-rate) 2区画モデルを用いて、特異的結合と非特異的結合とを識別することができ、この場合に該モデルにおける適合パラメーター (fitting parameters) は  $C_1$  (初期標的濃度) と  $C_2$  (非特異的に結合する種の初期濃度) である。Herron 等 (J. N. Herron, S. zumBrunner, J.-X. Wang, X.-L. Gao, H.-K. Wang, A. H. Terry, and D. A. Christensen, "Planar waveguide biosensors for nucleic acid hybridization reactions," *Proceedings SPIE* 3913, 177-184 (2000)) は、アビジンの代わりにニュートラアビジン単層を用いることによって、NSB が実際に排除されうることを示した。NSB 動力学を標的動力学から識別することができないような点まで NSB が起こっていると判明する場合には、Herron 等に従ってシラン化表面上にニュートラアビジン (タイプ I 実施態様では) 又はピオチニル化チオール (D. M. Disley, D. C. Cullen, H. X. You, and C. R. Lowe, "Covalent coupling of immunoglobulin G to self assembled monolayers as a method for immobilizing the interfacial-recognition layer of a surface Plasmon resonance immunosensor," *Biosensors and Bioelectronics* 13, 1213-1225 (1998)) (タイプ II 実施態様では) を用いるように、該誘導体化方法を改変し、続いて前述したように特徴付け方法を行なうべきである。

#### 【0080】

次に、標的種とバックグラウンド種の両方を用いて、測定を行なう。バックグラウンド・オリゴはナノキャビティ中に拡散して、ランダム・バックグラウンド・シグナルを生じる。3セットの測定を行なって、検出感度を決定する。第1セットは標的濃度  $C_n$  の関数としてであり、非特異的オリゴの濃度も  $C_n$  である。この状況は、2帯センサー・アレイ (two-zone sensor array) の条件をシミュレートする。第2セットは、非特異的濃度  $10 C_n$  以外に標的濃度  $C_n$  を有し、したがって、 $10$  帯アレイをシミュレートする。最後のセットは  $100 C_n$  の非特異的濃度を有する。2区画モデルから、次に、検出可能な最小標的濃度と、結合標的分子の結合数を知ることができる。検出限界は、導波管に関するよりもナノキャビティ・アーキテクチャでは  $M_{t, t} /$  の係数で低いことが予想される (導波管のエバネッセント場の表面強度と  $M_{t, t}$  が由来する石英基準表面上直接励起の強度との間の標準化 (normalization) を考慮し、この場合にこの標準化係数はオーダー 1 になるであろう (this normalization factor will be of order 1))。これらの測定は、ナノキャビティ・アレイが平面導波管に比べて改良されたバックグラウンド単離を有することを実証することになる (ハイブリダイゼーション・シグナルとバックグラウンド・ノイ



ズとの大きい比率によって証明されるように)。さらに、これらの研究は、標的濃度の定量測定値を得るために必要なハイブリダイゼーション時間の、該標的濃度の関数としての測定を可能にする(即ち、低い $C_T$ は長いハイブリダイゼーション時間を必要とする)。バックグラウンド単離と検出感度増強のために、必要なハイブリダイゼーション時間が導波管帯に比べてナノキャビティ・アレイ帯では少なくとも係数1/ 短いことが期待される。

#### 【0081】

検証研究(validation studies) アレイ系を検証するために、 $3 \times 3$ アレイ200(図8に例示する)を用いて、多重の合成標的(種々なオーバーラップ度を有し、2配列は単一塩基のみだけ異なる、5個の異なる60塩基長配列)にわたって、相補的プローブによって誘導体化された、5ハイブリダイゼーション帯86、88、90、92及び94と、残りの4帯80、80、82及び84を用いて、スクリーニングする。プローブ分子の固定化中に検出帯の相互単離を可能にするほど十分に大きく離して、検出帯を配置する。60塩基長を用いる目的は、60塩基長が臨床診断設定においてPCR生成物の配列長さをより典型的に表すからである。増大したオリゴ長さのために、ハイブリダイゼーション動力学は、拡散の減少によって以前の研究におけるよりも緩慢である。図8に例示するように、4基準帯のうちの2帯は、異なる濃度のCy-5標識プローブによって誘導体化し(蛍光強度基準として用いるため)、残りの2帯は抗T3によって誘導体化する(この場合には、Cy-5標識T3を、バックグラウンドとNSBのモデル供給源として全ての実験において高濃度で導入する)。

#### 【0082】

これらの研究において、種々な濃度(約10pM~1nM)の5標的種を100nM濃度のT3と共に、バックグラウンドとして導入する。この目的は、ハイブリダイゼーション動力学がハイブリダイゼーション帯にわたって標的濃度が異なるために強度に変化し、ヘテロ二本鎖形成が生じる、複雑な環境において5標的にわたる識別(各々の $C_T$ を得ることにに関して)を研究することである。この場合にも、標的濃度の定量測定の他に、重要な結果は、該測定と平面導波管との比較を行なうために必要なハイブリダイゼーション時間である。

#### 【0083】

これらの研究は、リアルタイム・ハイブリダイゼーション・アレイの検出帯としての金属ナノキャビティ・アレイの最終的な性能を決定する。臨床診断に関連した、特に、アッセイ時間が重要である感染症に関連した状況におけるこのプラットフォームの検証を行なう。非特異的結合の効果とヘテロ二本鎖形成が重要である複雑な環境においてさえ、標的濃度の定量測定がハイブリダイゼーション動力学によって30分間未満で行なわれうることが予想される。該手法のさらなる改良が電界強化ハイブリダイゼーションの使用によって可能になりうることも注目すべきである(R. J. Heaton, A.W. Peterson, and R. M. Georgiadis, "Electrostatic surface plasmon resonance: direct electric field-induced hybridization and denaturation in monolayer nucleic acid films and label-free discrimination of base mismatches," Proceedings of the National Academy of Sciences 98, 3701-3704 (2001); H.-J. Su, S. Surrey, S. E. McKenzie, P. Fortina, and D. J. Graves, "Kinetics of heterogeneous hybridization on indium tin oxide surfaces with and without an applied potential," Electrophoresis 23, 1551-1557 (2002))、この場合に、電界切り替えによる結合特異性の改良の他に、ハイブリダイゼーション動力学が増強されうる(2区画モデルにおける $k_M$ の値が増大するような、表面へのドリフト誘導オリゴ移動によって)ことが判明している。その上部にナノキャビティ・アレイ感知帯が組み立てられる金の金属層は、このような手法に当然適すると考えられる。

#### 【0084】

#### 4. 周期的金属ナノ構造アーキテクチャによる強化分子蛍光の定量測定と比較

下記研究は、リアルタイム・ハイブリダイゼーション・アレイのための3種類の周期的金属ナノ構造アーキテクチャの複雑な環境における蛍光強化メカニズムと検出感度を定量

的に比較するために設計する。各ナノ構造配置は、ハイブリダイゼーション動力学のリアルタイム測定のために導電性であり、大きいアレイ・フォーマットに拡大可能であり、他の方法論によって必要な分子増幅工程の必要性を回避するために十分な分子感度を有することができる。

#### 【 0 0 8 5 】

##### 4 . 1 金属ナノ構造アレイの組み立て

便宜的かつ再現可能性の両方であるナノ組み立て方法を開発するために、金属ナノ構造アレイの組み立ては、ハードマスクと金属乾式エッチングの必要性を回避するリフトオフ手法に基づくものである。金属の乾式エッチングは、再現可能な結果を得るために非常に厳重なプロセス制御を必要とする。それ故、リフトオフは、デバイス収率の有意な増加を生じる。

#### 【 0 0 8 6 】

製造の見地から費用がかかるとしても、電子ビーム・リソグラフィは、アカデミックな環境において、最も安定で、費用効果的及びフレキシブルなナノリソグラフィ・ツールである。金属ナノ構造アレイを作製するための他の手法は下記を包含する：干渉リソグラフィ(S. C. Lee and S. R. Brueck, "Nanoscale two- dimensional patterning on Si(001) by large-area interferometric lithography and anisotropic wet etching," Journal of Vacuum Science & Technology B 22, 1949-1952 (2004))、これは二つ以上の光学的平面波の干渉に基づいてフォトレジスト内のパターンを暴露する；ナノスフェア・リソグラフィ(W. A. Murray, S. Astilean, and W. L. Barnes, "Transition from localized surface plasmon resonance to extended surface plasmon-polariton as metallic nanoparticles merge to form a periodic hole array," Physical Review B 69, 165407 (2004))、この方法では、小誘電性スフェアの自己組織化単層が付着 / エッチング工程のマスクとして用いられる；及びナノインプリント・リソグラフィ(S. Y. Chou, P. R. Krauss, and P. J. Renstrom "Nanoimprint lithography," Journal of Vacuum Science & Technology B 14, 4129-1133 (2004))、この方法では、電子ビーム又は集束イオンビーム・リソグラフィを用いて、マスター上に任意のパターンを描いて、次に該マスターを用いて、多重コピーをスタンプアウトする（基本的には誘電層によって囲まれた薄い金属層であるCD及びDVDのために用いられる方法と同様に）。

#### 【 0 0 8 7 】

ナノキャビティ・アレイ・アーキテクチャ、ブルズアイ・アーキテクチャ、ナノ粒子アレイ・アーキテクチャを包含する3種類のアレイ・アーキテクチャを組み立てる。各アーキテクチャに対して、 $75\text{ }\mu\text{m} \times 75\text{ }\mu\text{m}$ のサイズである個別検出帯を作製する。

#### 【 0 0 8 8 】

ナノキャビティ・アレイ・アーキテクチャ ナノキャビティ・アレイを60nm厚さの金フィルム中に、電子ビーム・リソグラフィを用いて、続いて反応性イオン・エッチング(RIE)工程を用いて作製する。金属を清潔な石英基板上に、RFマグネトロン・スパッターリングによって付着させ、続いて300nm窒化ケイ素フィルムをプラズマ強化化学蒸着(PECVD)によって付着させる。次に、PMMAL層を45秒間、4000rpmで回転塗布し、焼成して、溶媒を除去する。同じ第2被膜を適用し、その後に付加的な焼成工程を行なって、総合厚さ350nmのPMMAL層を形成する。このポジティブ・レジスト上にナノキャビティ・アレイ・パターンを電子ビームを用いて描き、露出PMMALをMIBK:IPA 1:3の溶液中で70秒間現像した。該パターンをPMMALから $\text{CF}_4$ と $\text{O}_2$ のエッチングガスによってRIEを用いて窒化ケイ素に移して、その後に続けて、該パターンを $\text{Cl}_2$ と $\text{Ar}_2$ のエッチングガスによって金に移す。図9は、一つのナノキャビティ・アレイ30のSEMイメージ500を示す。アレイ30は $a = 1\text{ }\mu\text{m}$ と $d = 150\text{ nm}$ を有する。さらに、 $\text{SiON}$ の $\sim 20\text{ nm}$ 層(薄い接着層を先行させる)を、リフトオフ前に $\sim 100\text{ nm}$ 金属の上部に付着させる。リフトオフ後に、露出した金表面のみがナノキャビティの内壁である。この修飾した構造は二つの利点を有する。第1に、上部と底部の金属界面は、各界面3におけるSPPモードの有効伝播定数に関してほぼ

10

20

30

40

50

対称性であるので、これらのSPPモードの間には強い結合があり、大きな光伝達を生じる(L. Martin-Moreno, F. J. Garcia-Vidal, H. J. Lezec, K. M. Pellerin, T. Thio, J. B. Pendry, and T.W. Ebbesen, "Theory of extraordinary optical transmission through subwavelength hole arrays," Physical Review Letters 86, 1114-1117 (2001))、それ故、ナノキャビティ内に大きい強度強化を生じる。この対称性状況では、最大強度強化は7の係数であると推定される(H. J. Lezec and T. Thio, "Diffracted evanescent wave model for enhanced and suppressed optical transmission through subwavelength hole arrays," Optics Express 12, 3629-3651 (2004))。第2利益は、同じ表面修飾化学がナノキャビティとナノ粒子アーキテクチャとの間で共有されることができることであり、この場合に露出金表面の選択的誘導体化が行なわれる

10

励起波長よりやや小さいナノキャビティ間隔と、ナノキャビティ直径 $d \sim \lambda/3$ に関して、伝達強化が最大であることは、周知である(H. J. Lezec and T. Thio, "Diffracted evanescent wave model for enhanced and suppressed optical transmission through subwavelength hole arrays," Optics Express 12, 3629-3651 (2004))。しかし、ナノキャビティ効果のために、このことは蛍光発光に関しては最適ではないこともある。それ故、100~250nmの範囲のナノキャビティ直径を構成する。最適間隔は、垂直入射光に対して設計する。デテクターにおいて生じるバックグラウンド・シグナルからの伝達励起光(即ち、分光フィルターを通しての漏出)を最小にするために、750~850nm範囲の間隔を用いる、これが $\pm 10^\circ$ 円錐半角にわたる表面に垂直な蛍光発光の収集を可能にし、 $12 \sim 17^\circ$ で出射する伝達励起光を収集しないからである。サンプル作製後に、垂直入射における波長に対する及び一定波長(633nm)における入射角に対する線形伝達測定を行なう。これらの測定が、伝達を最大化し、サンプル毎の再現性を決定するパラメーター最適化を可能にする。

20

#### 【0089】

ブルズアイ・アーキテクチャ このアーキテクチャのナノ組み立ては、ナノキャビティ・サブアレイよりもかなり複雑である。このアーキテクチャを組み立てるための新規な方法は、電子ビーム・リソグラフィに基づくものでありうる。この方法は、1回の電子ビーム・リソグラフィ工程から次の電子ビーム・リソグラフィ工程への正確な位置決め(約60nmより良好な)を必要とする。第1工程は、光学的リソグラフィを用いて基板上に位置決めマークを配置することである。これらの位置決めマークは小さい金クロスを用いて作製され、電子ビーム系のほぼ視野である、 $80\mu\text{m} \times 80\mu\text{m}$ 方形のコーナーに配向される。次の工程は、環状波形(circular corrugations)の $3 \times 3$ サブアレイを、 $S = 2.5\mu\text{m}$ の中心から中心までの間隔で石英基板中にパターン化することである。この方法は、電子ビーム・リソグラフィによってポジティブ・レジストを用いて行なわれる。露出の前に、電子ビームをイメージング・モードに切り替えて、キャリブレーション・マークを設置する。設置したならば、制御コンピューター上に、コーナーに位置決めマークを有するグリッドを作製することができる。次に、ブルズアイ・サブアレイ・パターンを、633nmの励起波長に対してほぼ最適である周期性580nmで、このグリッド上に座標を用いて露出する(T. Thio, K. M. Pellerin, R. A. Linke, H. J. Lezec, and T.W. Ebbesen, "Enhanced light transmission through a single subwavelength aperture," Optic Letters 26, 1972-1974 (2001))。最大強化を得るために、約10個の環状リングで充分である。露出と現像後に、石英基板を約40~50nmの深さまで乾式エッチングする、この深さはこの場合もほぼ最適である(エッチがあまりに深いと、金のこれらの環状部分が殆ど透明になる)。ここから、この方法は、電子ビーム・リソグラフィ中に各環状波形の中心にナノキャビティを配置するために必要な付加的な位置決め工程を除いて、ナノキャビティ・アレイの組み立て方法に従う。リフトオフは、ブルズアイの中心にナノキャビティを残すが、該波形(corrugations)は、波形基板上への沈着によって自動的に作られる(又はクローン化される(cloned))。作製後に、これらのサンプルをSEMによってイメージングして、ブルズアイ波形の中心に関してナノキャビティの配置を定める。次に、線形伝達スペクトルを測定して、伝達強化係数と、該強化に対する配置精度の効果を決定する

30

40

50

。上面 S P P モードの有効波長は約  $\lambda = 633 \text{ nm}$  であるので、約 0.1 精度が必要である。F E M L A B に綿密な電磁的シミュレーションを用いて、配置精度を実証する。必要な位置決め精度を決定した後に、許容できる配置を有するブルズアイ・ナノキャビティ・パターンは特定の用途に用いられる。デバイス収率が低すぎる（即ち、25%未満）場合には、この構造のナノキャビティを、d b F I B を用いて正確にミルすることができる。

#### 【0090】

ナノ粒子アレイ・アーキテクチャ このアーキテクチャは、作製するのが最も簡単である。ポジティブ電子ビーム・レジスト（例えば、P M M A）を石英基板上に回転塗布し、焼成する。次に、レジストを所望のナノ粒子アレイ・パターンで露出させる。現像は露出した面積を除去する。クロム接着層と金属を付着させた後に、レジストがリフトオフ・プロセス中に除去されて、金属ナノ粒子アレイが残される。1例のナノ粒子アレイ・パターン190を図10に示す。パターン190は粒子192を包含し、この場合に、粒子は長軸113 nmと、短軸60 nmを有し、厚さが30 nmである、楕円形の形状である。

#### 【0091】

ナノキャビティ・アーキテクチャとは対照的に、ナノ粒子の局部表面プラズモン・モード中への結合が、図1に例示するように、プリズムからの総内部反射（T I R）を介して生じるので、反射モードでのナノ粒子アレイに対して光学的試験を行なう。ナノ粒子を周期的方形格子において  $\sim 150 - 250 \text{ nm}$  で配置する、これは個々のナノ粒子共鳴をシフトさせ、弱めると考えられる如何なる粒子-粒子相互作用をも防止するが(W. A. Mur ray, S. Astilean, and W. L. Barnes, "Transition from localized surface plasmon resonance to extended surface plasmon- polariton as metallic nanoparticles merge to form a periodic hole array," Physical Review B 69, 165407 (2004))、他方では同時に  $\lambda / 2$  として入射励起光から如何なる回折オーダをも排除する。反射においては、各ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴はディップ(dips)によって表示する（ナノキャビティに関する伝達におけるピークとは対照的に）。ナノ粒子の形状及び厚さは、T I R 照明下で633 nmにおける吸収を最大にするように、長軸110 nmと短軸100 nmを有し、厚さ30 nmであるほぼ楕円形として設計される。

#### 【0092】

幾何学的制御の改良 電子ビーム・リソグラフィにおける長時間露出中に起こる問題の一つは、書き込みビームの安定性である。電子ビームの熱ドリフトは、アレイ中のナノキャビティの位置に僅かな変化を生じる可能性がある。この問題は、パターンの複雑さが増すと共に悪化する。例えば、ナノキャビティの不均一な間隔（即ち、不均一な広がり）は、表面プラズモンの励起効率の低下、それによるナノキャビティ内の達成可能な強度強化係数(intensity enhancement factor)を減ずることである。幾何学的不均一性は、“より高速な”電子ビーム・レジストを用いる場合に、かなり弱めることができる。高速レジストは、少ない照射線量を必要とし、それ故、同じパターンを少ない時間で書き込むことができる、但し、これらのレジストは低い分解能を有する傾向がある。パターンに対して十分な分解能を保持する、より高速なレジストを見出すために、多くの異なるポジティブ及びネガティブ・レジストを検討することができる。

#### 【0093】

#### 4.2 ナノ構造の選択的誘導体化

ナノ構造アーキテクチャのための選択的表面修飾方法を開発し、特徴付けるように、下記研究を設計する。

#### 【0094】

蛍光強化の測定のための表面修飾 金属表面の不動態化方法は、蛍光発光単層がナノキャビティの底部の石英表面のみを被覆するように開発されてきた。該不動態化方法はPrime等(K. L. Prime and G. M. Whitesides, "Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self- assembled monolayers," Journal of the American Chemical Society 115, 10714-10721 (1993))

10

20

30

40

50

に従う；m P E G - チオール（粉末形）をエタノール中に  $1 \mu\text{mol/L}$  の濃度に溶解する；該溶液を  $\text{N}_2$  充填グローブ・ボックス中で室温及び大気圧において金表面に 24 時間適用し、次に、エタノール中ですすぎ洗いし、 $\text{N}_2$  中で乾燥させる；標識アビジン溶液を適用して、単層を形成する。この方法のための基準表面は、不動態化及び単層塗布後に、蛍光顕微鏡で測定可能な蛍光シグナルを生じなかった平滑な金表面と、不動態化及び単層塗布後に、不動態化なしの被覆石英表面のほぼ 85 % の蛍光シグナルを生じた（これは恐らく結合表面濃度がやや低下した結果であると思われる）石英基板からなるものであった。

#### 【0095】

同様な方法をナノ構造アレイ・アーキテクチャのために開発することができる、この場合には、誘電性表面を不動態化して、ナノキャビティの露出金側壁又はナノ粒子の露出金表面上にのみ単層形成を可能にする。誘電性表面の不動態化はm P E G - シランを用いて行なう。次に、Cy - 5 標識アビジン溶液の導入が、露出金表面上の単層形成を可能にする。或いは、該側壁の選択的誘導体化も用いることができ、この方法はピオチニル化チオールによって開発された方法に従い(D. M. Disley, D. C. Cullen, H. X. You, and C. R. Lowe, "Covalent coupling of immunoglobulin G to self-assembled monolayers as a method for immobilizing the interfacial-recognition layer of a surface plasmon resonance immunosensor," Biosensors and Bioelectronics 13, 1213-1225 (1998))、ここでピオチニル化チオールは金表面に強く結合する。次に、Cy - 5 標識ニュートラアビジンを単層形成に用いる、この場合、ニュートラアビジンは該誘電性表面との電荷 - 電荷相互作用を受けないが、ピオチン結合サイトの二つを介してピオチン層と強く相互作用する。第3代替手段は、m P E G - シランによって不動態化し、露出金表面をチオール共役オリゴ(thiol-conjugated oligos)によって誘導体化することである(J. Malicka, I. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, "DNA hybridization assays using metal-enhanced fluorescence," Biochemical and Biophysical Research Communications 306, 213-218 (2003))。これらの方法を二つの基準表面：不動態化後に、測定可能な蛍光を示さない石英表面と、走査型共焦点蛍光顕微鏡によって測定したときに、強い蛍光を示す金表面とによって試験する。

#### 【0096】

新しい方法を最初にナノ粒子アーキテクチャ上で試験する、この場合に、反射モードで蛍光顕微鏡による直接イメージングを用いて、Cy - 5 / アビジンによるナノ粒子の選択的誘導体化を測定することができる。他の二つのナノキャビティ・アレイを次に試験することができる。反射モードを用いることによって、上面からの蛍光が存在しないことを実証することができる；ナノキャビティ内部からの蛍光を検出することができる。さらなる実証として、伝達モードを用いて、検出可能な蛍光のみがナノキャビティから生じることを実証することができる。

#### 【0097】

これらの表面修飾方法は、ナノ規模の容積中へ及びナノ規模の容積からの質量移動を含めた多重の工程を必要とするので、最終の誘導体化表面を完全に特徴付けることが重要である。特徴付け研究の背後にある一つの動機付け要因は、ナノキャビティ内又はナノ粒子上の結合アビジン表面濃度を知ることである。特徴付け方法は本明細書の実施例4に記載する。

#### 【0098】

核酸ハイブリダイゼーションのための表面修飾 T3 ポリメラーゼ・プロモーター・サイトを核酸ハイブリダイゼーションのためのモデル系として用いて、3 種類のアーキテクチャにわたるバックグラウンド単離と分子感度を測定する。T3 5' - (AATT AACCTC AC T AAAGG) - 3' と相補的抗 T3 は商業的に入手可能であり、Cy - 5 によって蛍光標識することができる。キャプチャー・オリゴヌクレオチド（これらの研究のための抗 T3）をナノ構造上に固定化する。アビジン単層の形成に続いて、0.1 ~ 10.0  $\mu\text{M}$  5' - ピオチニル化抗 T3 の溶液を加える、これはアビジン被覆表面の上部で自己組織化する(J.

N. Herron, S. zumBrunner, J. -X. Wang, X.-L. Gao, H.-K. Wang, A. H. Terry, and D. A. Christensen, "Planar waveguide biosensors for nucleic acid hybridization reactions," *Proceedings SPEE* 3913, 177-184 (2000)). ( $^3\text{ }^2\text{ }^3\text{ P}$ ) ホスフェートによる末端標識によって、放射性標識オリゴヌクレオチド(研究のこの部分のための抗 T 3) を作製する。固定化キャプチャー・オリゴ(即ち、抗 T 3) の表面濃度を測定するために、 $5'$  - ビオチニル化オリゴを( $^3\text{ }^2\text{ }^3\text{ P}$ ) A T P によって末端トランスフェラーゼを用いて標識する。この酵素は該オリゴの  $3'$  末端に( $^3\text{ }^2\text{ }^3\text{ P}$ ) A M P を加える。商業的な  $3'$  末端標識キット(Perkin Elmer)を用いて、反応を行なう。付加的なアデノシン基は、固定化アビジン単層への該標識オリゴの結合を妨害しないと期待される。式(1)によって前記と同じ方法を用いて、放射性標識効率を算出する。比放射能を、 $260\text{ nm}$ において  $U\text{ V} - \text{vis}$  分光光度計を用いて測定する。アビジン単層上の放射性標識した抗 T 3 の自己組織化後に、プローブ表面濃度を、放射性同位体デテクターを用いて、式(2)によって算出する。各ナノ構造の表面濃度を平面基準サンプルに関して得られた表面濃度と比較する。ナノキャピティのための誘導体化方法は、この比較の結果として、溶液中の抗 T 3 濃度の調節によって又は吸着時間の变化によって調節することが必要になりうる。

【0099】

#### 4.3 蛍光強化の比較

該3種類のアーキテクチャの各々による総蛍光強化の詳細な比較研究を行なう。Lakowiczのグループによる測定(J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, "Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dye-labeled oligonucleotides," *Analytical Biochemistry* 315, 57-66 (2003))は、Cy - 5の蛍光寿命が、ナノ構造化金属表面上で約  $1.3\text{ ns}$  から  $100\text{ ps}$  まで短くなる可能性があることを示した、このことが、このような短時間分解能を有する系を構築することが必要である一つの理由である。簡略化現象論的モデルにおいて、3種類のアーキテクチャ全てに関する総蛍光強化は、3係数の積 -  $M_{\text{tot}} = M_{\text{sp}} M_{\text{rad}} M_{\text{rate}}$  によって与えられ、式中、 $M_{\text{sp}}$  は表面プラズモン結合による入射強度の強化係数であり、 $M_{\text{rad}}$  は、金属ナノ構造と分子放射双極子との相互作用による蛍光の強化であり(L. A. Blanco and F. J. G. do Abajo, "Spontaneous light emission in complex nanostructures," *Physical Review B* 69, 205414 (2004); Y. Liu and S. Blair, "Enhanced fluorescence transduction properties of metallic nanocavity arrays," submitted to *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* (2005))、そして  $M_{\text{rate}}$  は放射伝達率の増大に関連した強化係数である(J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, "Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dye-labeled oligonucleotides," *Analytical Biochemistry* 315, 57-66 (2003); L. A. Blanco and F. J. G. do Abajo, "Spontaneous light emission in complex nanostructures," *Physical Review B* 69, 205414 (2004))。積  $M_{\text{yield}} = M_{\text{rad}} M_{\text{rate}}$  は、実際の量子効率は大きく増加しないとしても、蛍光収率の見かけの増加を生じる。フルオルの蛍光量子効率は、下記式で与えられる：

$$QE = k_r / (k_r + k_{nr})$$

式中、 $k_r$  は放射率(radiative rate)であり、 $k_{nr}$  は脱励起の非放射率(nonradiative rate of de-excitation)である。放射率が新しい値  $k_r'$  に修飾されている場合には、蛍光強化は係数  $M_{\text{rate}} = QE' / QE$  によって与えられる、式中、 $QE' = k_r' / (k_r' + k_{nr})$ 。それ故、強化の量はフルオルのネイティブ QE に強く依存する。Cy - 5 に関して、 $QE \sim 28\%$ ；それ故、QE は、最大 3.6 倍だけ増大することができる。しかし、金属表面へフルオルが近接すると、例えば、フォノン又は表面電磁波へのエネルギー移動のような、新しい非放射経路が導入される可能性がある。さらに、これは、Q の匹敵する減少と共に蛍光寿命の減少を生じ、収率を変化しないまま残す可能性がある。

【0100】

3種類の測定を行なって、これらの係数を決定して、3種類のアーキテクチャを比較することができる。総蛍光出力とフォトブリーチング時間の測定を、基準表面に比較して行

なう。これらの測定は、 $M_{sp}$ と $M_{yield}$ の推定を可能にする。蛍光寿命の測定を行なって、これから $M_{rad}$ と $M_{rate}$ の相対的寄与率を推定することができる。初期測定はCy-5標識アビジンを用いて行なう、このためにフルオル～金属分離は約5nmである。3強化係数はこの分離に強い依存性を有する可能性があるので(9nm分離で最大の強化が生じた、ナノ構造銀表面上のCy-5に関する関連研究に示されるように(J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, "Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dye-labeled oligonucleotides," Analytical Biochemistry 315, 57-66 (2003))、簡単な手法を用いて、アビジンとピオチニル化BBA(BBSA)との交互層を用いてこの距離依存性を実験的に研究する。単層シーケンスはアビジン: Cy-5で始まる; シーケンスにおける次の工程はアビジン: BBSA: アビジン: Cy-5等である。各工程において層厚さを偏光解析法によって測定して、表面濃度を放射性標識によって測定する。

10

#### 【0101】

各アーキテクチャに関して、双極子の放射特性(全ての配向を用いて)の綿密な電磁的シミュレーション(FEMLABを用いる)を金属ナノキャビティ内又は金属ナノ粒子に隣接してのいずれかで行なう。実験条件を模倣するために、双極子-金属の距離を約5nmから約25nmまで変化させる。実験結果と組み合わせて、これらのシミュレーションの結果は、金属ナノ構造への近接の結果として生じる光物理的プロセスをさらに洞察することができる。これらの研究はさらに、強化された蛍光の利点をなおも維持しながら、用いることができる最大オリゴ長さも決定する; 予備研究は、ナノキャビティ内で60塩基オリゴが有意な(即ち、最大の1/2より大きく)強化をまだ維持する(Y. Liu and S. Blair, "Enhanced fluorescence transduction properties of metallic nanocavity arrays," submitted to IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics (2005))ことを示唆する。

20

#### 【0102】

ナノキャビティ・アレイ・アーキテクチャ 以前の研究は、表面プラズモン結合による強度強化係数 $M_{sp}$ が約2の係数であるが、本明細書に述べる新規な対称的構造によると、この係数はほぼ7にまで増大する可能性がある(H. J. Lezec and T. Thio, "Diffracted evanescent wave model for enhanced and suppressed optical transmission through subwavelength hole arrays," Optics Express 12, 3629-3651 (2004))。ナノキャビティ内の励起強化の原因は、伝達強化の条件下で(Y. Liu and S. Blair, "Fluorescence enhancement from an array of sub-wavelength metal apertures," Optics Letters 28, 507-509 (2003))、エネルギーがナノキャビティ内に集中するという事実から生じる。ナノキャビティの周期性は自由空間からの入射光が表面プラズモンモード中へ結合するのを支持するのみでなく、ナノキャビティ内の建設的干渉を生じる、ナノキャビティ壁からのコヒーレント散乱によって、表面プラズモンの伝播特性をも修飾する(I. I. Smolyaninov, W. Atia, and C. C. Davis, "Near-field optical microscopy of two-dimensional photonic and plasmonics crystals," Physical Review B 59, 2454-2460 (1999))。ランダム・ナノキャビティ配置を用いた以前の研究は、さらに、蛍光収率の正味の強化が約9(150nm直径キャビティにおける場合)から約7(200nm直径キャビティにおける場合)までの範囲であることを実証した。この観察は、ナノキャビティ幾何学が、恐らくはナノキャビティ・アスペクト比 $h/d$ ( $h$ は高さである)に基づいて、フルオルの発光特性に対して強い影響を及ぼすことを示唆する。この影響を、100~250nm直径の範囲のナノキャビティ直径を用いて、そしてシミュレーションからの結果と比較することによって、実験的に研究することができる。幾何学的依存性の結果として、実験成果はLakowiczのものとは異なる可能性がある(J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, "Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dye-labeled oligonucleotides," Analytical Biochemistry 315, 57-66 (2003))、例えば、強化効果がナノ構造平面で生じる場合であり、これは放射率の増大を生じることが知られている(A. Wokaun, H.-P. Lutz, A. P. King, U. P. Wild, and R. R. Er

30

40

50

nst, "Energy transfer in surface enhanced luminescence," Journal of Chemical Physics 79, 509-514 (1983)).

#### 【0103】

これらの測定において、周期的ナノキャビティ・アレイ及びランダム・ナノキャビティ・アレイからの蛍光出力を、同じ表面濃度（放射性標識によって測定）を有する石英表面から成る基準表面からの出力と比較する。該ナノキャビティ・アレイからの出力を、フルオルはナノキャビティの内壁のみを被覆するので、 $f = dh / 2$ （これは、ナノキャビティ充填比率  $= (d/2)^2 / \sim^2$  とは異なる）によって与えられる、フルオルの充填比率に合わせて標準化する。総蛍光強化係数  $M_{tot}$  は、周期的アレイからの標準化蛍光出力の基準表面に対する比率によって与えられ、表面プラズモン励起強化係数  $M_{sp}$  は周期的アレイとランダムアレイとの蛍光比率によって与えられる。これらの数量から、蛍光収率の見かけの増加を、比率  $M_{yield} = M_{tot} / M_{sp}$  によって算出することができるが、光物理的プロセスに対するナノキャビティ幾何学の影響をより良く理解するために、さらなる測定を比較して、周期的及びランダム・ナノキャビティ・アレイ幾何学と基準にわたってフォトリチング時間及び蛍光寿命を比較することができる。

10

#### 【0104】

異なる3サンプルを用いた測定の全てを各幾何学に関して行なう。各基板上に多重サンプルを作製して、効率を大きく改良することができる。これらの測定値からの標準偏差は、パターン作製、単層塗布、及び光学的配置と検出における変化を表す。本出願人の以前の方法によると、平均値の10%未満の標準偏差が得られた。新規な作製方法と表面修飾方法は、該偏差を5%未満に減少させると期待される。

20

#### 【0105】

ブルズアイ・ナノキャビティ・アーキテクチャ ナノキャビティ・アレイの表面プラズモン強化係数が小さい理由は、ナノキャビティ自体の周期性を用いて、入射光を表面プラズモン・モードに結合させるという事実による。 $\gamma$  を維持して、バックグラウンド単離を改良するために、ナノキャビティの充填比率は小さい（弱い回折格子を生じる）。ブルズアイ・ナノキャビティ幾何学は、表面プラズモン・モードに結合する格子のために分離した、より大きく効率的な構造 - 波形環状リング（入射光の非常に大きな割合を中央のナノキャビティに再分配する）を用いることによって、これらの制約(constraints)を破る。単一の裸の(bare)ナノキャビティに比較して、ブルズアイ・ナノキャビティを通った光第二次高調波発生の測定(A. Nahata, R. A. Linke, T. Ishi, and K. Ohashi, "Enhanced nonlinear optical conversion using periodically nanostructured metal films," Optics Letters 28, 423-425 (2003))は、ブルズアイ・ナノキャビティ内の表面プラズモン強度強化  $M_{sp}$  が  $\sim 100$  であることを示す。ブルズアイ・アーキテクチャの主な欠点は、環状リング構造がナノキャビティよりもかなり大きく、帯内の検出サイトの密度を減ずることである。

30

#### 【0106】

ナノキャビティ・アレイ・アーキテクチャに関して前述したように、3サンプル -  $3 \times 3$  ブルズアイ・アレイと、 $S = 25 \mu m$  を有する  $3 \times 3$  ナノキャビティ・アレイと、石英表面 - を比較する。 $3 \times 3$  ナノキャビティ・アレイの目的は、表面プラズモン励起強化をナノキャビティ関連効果から単離しながら、同じフルオル充填比率  $f = dh / S^2$  を維持することである。表面プラズモンの減衰長さよりも大きい  $25 \mu m$  間隔において、これらのナノキャビティは、コヒーレントに相互作用せず、そのため、独立したキャビティとして作用する。これらの測定から、有意に大きい励起強化係数  $M_{sp}$  が、非常に類似した収率強化  $M_{yield}$  と共に予想される。ブルズアイ構造において各ナノキャビティを囲む環状波形のために、フルオルの放射特性は、裸のナノキャビティの放射特性から修飾されることができ、これは放射効率  $M_{rad}$  に影響を及ぼすと考えられる。このことは、電磁的シミュレーションによって実証することができる。 $M_{rad}$  の可能な修飾によってさえ、強化効果対ナノキャビティ直径  $d$  及びフルオル - 側壁分離を比較する網羅的研究を繰り返すことは不必要であり、したがって、ブルズアイ・パターンを作製する必要は

40

50



殆どないと予想される。

#### 【0107】

ナノ粒子アーキテクチャ ナノキャビティの局部プラズモン共鳴に関連した大きい吸収横断面のために、金属ナノキャビティによる大きい表面の強化効果は20年以上前から知られている(M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan, "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode," Chemical Physics Letters 26, 163-166 (1974); H. G. Craighead and A. M. Glass "Optical absorption of small metal particles with adsorbed dye coats," Optics Letters 6, 248-250 (1981))。局部プラズモン共鳴によるピーク吸収の波長は、ナノ粒子の幾何学によって決定される。ナノ粒子は、長軸約110nm、短軸約100nm、厚さ30nmを有する楕円形の形状であり、これは、一つの線形分極状態(励起光の分極状態)で633nm近くに局部プラズモン吸収のピークを有し、分極の直交状態では670nm(Cy-5のピーク蛍光波長)近くに局部プラズモン共鳴のピークを有する。楕円形ナノ粒子の使用は、二重共鳴効果を生じて、蛍光出力を最大化することができる(H. Ditlbacher, N. Felidj, J. R. Krenn, B. Lambrecht, A. Leitner, and F. R. Aussenegg, "Electromagnetic intereaction of fluorophores with designed 2D silver nanoparticle arrays," Applied Physics B 73, 373 (2001))。ナノ粒子アレイによると、ナノ粒子は相互作用しないので、励起強化係数 $M_{s_p}$ を $M_{y i e l d}$ から直接単離する方法がない;それ故、石英基準表面に基づいて比較を行なう。ナノ粒子アレイから測定された蛍光を、ナノ粒子の充填比率 $= (d/2)^2 /$   
 $^2$ に合わせて標準化して、基準サンプルと比較して、総蛍光強化係数を得る。この充填比率は、が非常に小さいので、ナノキャビティ・アレイの充填比率よりも有意に大きい。

#### 【0108】

ナノ粒子アレイに関して、ナノ粒子アレイと基準表面とのフォトリーチング時間と蛍光寿命の比率から $M_{s_p}$ を推定することができる。ナノキャビティ・アレイの場合と同様に、これらの測定は、フルオル-粒子の間隔の関数として行なうが、Lakowiczと同様に定性的に結果を得ると予想される(J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, "Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dye-labeled oligonucleotides," Analytical Biochemistry 315, 57-66 (2003))。全般的に、総強化係数 $M_{t o t} > 10$ が予想され(H. Ditlbacher, N. Felidj, J. R. Krenn, B. Lambrecht, A. Leitner, and F. R. Aussenegg, "Electromagnetic intereaction of fluorophores with designed 2D silver nanoparticle arrays," Applied Physics B 73, 373 (2001); J. Malicka, I. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, "DNA hybridization assays using metal-enhanced fluorescence," Biochemical and Biophysical Research Communications 306, 213-218 (2003); J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz "Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dye-labeled oligonucleotides," Analytical Biochemistry 315, 57-66 (2003))、該強化の大部分は $M_{s_p}$ によるものである。総蛍光強化は、ナノキャビティ・アーキテクチャに関するよりもナノ粒子に関するほうが分離により敏感であると予想される。

#### 【0109】

表面プラズモン強化係数 $M_{s_p}$ は、 $M_{y i e l d} = M_{r a d} M_{r a t e}$ によって与えられる収率強化を越える付加的な強化を表す。この付加的な強化は、蛍光変換がフォトリーチング限定されない(fluorescence transduction is not photobleaching limited)状況下で重要である。一つの状況は、有意にフォトリーチしない量子ドット蛍光ラベルを使用する状況である(M. B. Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos, "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels," Science 281, 2013-2016 (1998); W. C. W. Chan and S. Nie "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotropic detection," Science 281, 2016-2018 (1998))。単一帯を含む金属ナノ構造アレイによると、同じ帯面積を有する石英基板上の直接励起に比べて、同数の蛍光分子に関して係数 $M_{s_p} M_{y i e l d}$ による付加的な蛍光シグナル増加、又は同じ蛍光

レベルであるときに、係数  $M_{s p} M_{y i e l d}$  による分子数の減少といった実際的な利益が得られる。他の状況は、入射光が全ての帯の間で均等に分割される多重帯感知アレイを同時変換する状況である。次に、フォトブリーチするフルオルの場合においても、実際の利益は、 $M_{s p}$  帯を横切る光の拡散が、帯当たりの分子数が同じである石英基板上の一つの帯に比べて、同じブリーチング時間によって各帯から  $M_{y i e l d}$  倍大きい出力を生じることである。各帯から、石英基板と同じ蛍光出力によって、但し、フォトブリーチに非常に長い時間を要して、 $M_{s p} M_{y i e l d}$  帯を励起させることもできる。これらの係数は、ナノ構造アレイ・アーキテクチャの他の重要な利益、バックグラウンド単離の利益（これは、これらの規模(scalings)をさらに少なくとももう一桁だけ改良する）を考慮していない。

10

#### 【0110】

#### 4.4 リアルタイム・ハイブリダイゼーションにおける感度の比較

ナノ構造アーキテクチャの性能利益を、種々な濃度のバックグラウンド種の存在下での蛍光変換を用いて、単一帯上でのリアルタイム・ハイブリダイゼーション動力学の研究によって数量化する。標的種としてRNAを用いる（直接発現分析における場合であるように）代わりに、末端標識一本鎖DNA（即ち、20塩基長さのオリゴヌクレオチド）を用いる。この理由は、DNAがかなり堅固であり、サンプル取り扱い及び貯蔵に殆ど予防処置を要さず、それ故実験方法を簡易化することである。これらの結果は、本明細書に述べる構造を用いて行なうことがさらにできる発現RNAの直接分析に非常に適切である。T3ポリメラーゼ・プロモーター・サイトをモデル系として用いる；T3及び相補的抗T3は商業的に入手可能であり、Cy-5によって蛍光標識することができる。キャプチャー・オリゴヌクレオチド（これらの研究のための抗T3）は、既述したように、選択的に固定化される。蛍光標識した標的種と非標的種を含有するサンプル溶液を、ナノ構造サンプルの上面に存在するフローセル（図4参照）を用いて表面に導入する。既述したような2区画モデルを用いて、動力学曲線を分析する。これらのパラメーターは図6に例示する。2区画モデルを用いる目的は、適合定数  $k_M$  によって、検出サイトのまばらなアレイ(sparse array)への質量移動の効果を算出して、充填比率が100%である平面導波管感知モダリティ(planar waveguide sensing modality)と比較することができることである。非特異的結合の効果を識別するために、該2区画モデルを結合定数  $k_{a1}$  と  $k_{a2}$  による表面への2種類の種の結合を表すように改変する。この場合に、二つの結合濃度  $B_1(t)$  と  $B_2(t)$  が得られ、有効結合サイトの密度は  $R_T - B_1(t) - B_2(t)$  によって与えられる。非特異的種の解離の効果を組み込むことも可能である。発現アレイの最終目的が、2区画モデルを用いて、各ハイブリダイゼーション帯における動力学的曲線を分析して、溶液中の所望の標的の未知濃度  $C_T$  を得ることであることは、認識されていない。

20

30

#### 【0111】

リアルタイム・ハイブリダイゼーション実験を行なう前に、結合表面濃度と蛍光強度との間のキャリブレーションを行なう。既述したように、放射性標識を用いて、結合したプローブ濃度を得ることができる。Cy-5末端標識した抗T3（UV-vis吸収によって測定される標識比率で）による同じ表面修飾方法を行なって、測定された蛍光強度と結合濃度とを直接関係づけることができる。次に、この関係を2区画モデルと共に用いて、結合した標的分子数に関して検出限界を知ることができる。

40

#### 【0112】

検出感度 - ナノキャビティ・アーキテクチャの測定 このセクションでは、非結合種からの蛍光単離を実証して、周期的ナノキャビティ・アレイ及び3×3ブルズアイ・アレイに関して非特異的結合を考慮して、検出感度を決定する。検出可能な蛍光は、ナノキャビティ内からのみ生じることができるので、非標的分子からの蛍光のランダムな変化は、このような分子がナノキャビティ中へ及びナノキャビティからランダムに拡散する場合にのみ生じる（若干の部分が非特異的に結合しうるとしても）。ナノキャビティ表面積は、総帯面積の一部（ナノキャビティ・アレイでは ~ 1 - 4 % 及びブルズアイ・アレイで

50

は  $\sim 0.01\%$  ) を表すので、非結合種からのバックグラウンド・シグナルは、例えば平面導波管又は感知表面が帯面積の  $100\%$  を表す蛍光-SPRのような、他のウォッシュレス表面選択的蛍光センサーにおけるよりも約  $1/\quad$  の係数で低いことになる。

#### 【0113】

ナノキャピティ・アーキテクチャ内の変換面積は非常に小さいので、標的分子の感知領域中への拡散は、変換面積が感知面積の  $100\%$  である場合よりも緩慢でありうる。第1工程は、標識標的のハイブリダイゼーション動力学を溶液中の標的濃度の関数として、平面導波管に比較して、研究することである。 $C_y - 5$  色素によって  $5'$  末端において標識した標的オリゴ ( $T_3$ ) を、濃度  $C_n$  を有する溶液中に用意する、この場合  $n$  は試行回数である。典型的なモル濃度は  $10^{-8} \sim 10^{-12}$  の範囲である。フローセル中に導入すると、 $T_3$  はキャプチャー単層上のプローブ・オリゴに特異的に結合して、ハイブリダイズしたDNAを形成する。ハイブリダイゼーション動力学曲線 74 を各  $C_n$  に関して、各ナノキャピティ内の光強度によって励起された蛍光の時間依存性によって測定する (図5におけるように)。結合 (即ち、binding) 曲線 76 と解離曲線 78 の両方を、図7に例示するように、得る。解離曲線 78 を、バッファー溶液をフローセルに通して流すことによって形成する、これは  $k_d$  の決定を可能にする ( $k_d$  は特異的結合に関しては本質的にゼロになり、非特異的結合に関しては、次のパラグラフで説明するように、非ゼロである)。大きく異なる充填比率を有する、二つのナノキャピティ・アーキテクチャと導波管との動力学曲線を比較することによって、拡散時間の増加はパラメーター  $k_M$  によって算出することができる。

10

20

#### 【0114】

次の工程は、 $T_3$  / 抗  $T_3$  と同じ長さの第2標識配列を用いて同じ測定を行なって、非特異的結合に関して2区画モデルにおいて動力学的係数を決定することである。これらの“バックグラウンド”オリゴの配列は、標的分子又はプローブ分子のいずれとも特異的に結合しないように選択する。これらのバックグラウンド・オリゴはナノキャピティ中に拡散して、結合種によって得られた動力学曲線を遮蔽する可能性があるランダム・バックグラウンド・シグナルを発生する、そしてさらには非特異的に結合して (但し、異なる率及び平衡値で)、標的種の動力学を模倣するシグナルを発する可能性がある (H. Dai, M. Meyer, S. Stepaniants, M. Ziman, and R. Stooughton, "Use of hybridization kinetics for differentiating specific from non-specific binding to oligonucleotide micro arrays," Nucleic Acids Research 30, (2002))。前述したように、これらの測定は  $C_n$  の関数として行なわれ、この場合に、 $10^{-6} \sim 10^{-10}$  の範囲内の大きい濃度が用いられる。動力学的係数 ( $k_{a2}$  と  $k_{d2}$ 、これらは非特異的種の濃度にわたって比較的一定であるべきである) の決定から、次に、改変二重率2区画モデルを用いて、特異的結合と非特異的結合とを識別することができ、この場合に該モデルにおける適合パラメーターは  $C_1$  と  $C_2$  である。

30

#### 【0115】

3セットの測定を行なって、検出感度を決定する。第1セットは、標的濃度  $C_n$  の関数としてであり、この場合に、非特異的オリゴの濃度も  $C_n$  である。この状況は、2帯センサー・アレイの条件をシミュレートするものである。第2セットは標的濃度  $C_n$  を有するが、非特異的濃度は  $10C_n$  であり、したがって、 $10$  帯アレイをシミュレートする。最後のセットは非特異的濃度  $100C_n$  を有する。2区画モデルから、検出可能な最小標的濃度と、結合標的分子の結合数を知ることができる。検出限界は、導波管に関するよりもナノキャピティ・アーキテクチャでは  $M_{t.o.t} / \quad$  の係数で低いことが予想される (導波管のエバネッセント場の表面強度と  $M_{t.o.t}$  が由来する石英基準表面上直接励起の強度との間の標準化を考慮する、この場合にこの標準化係数はオーダー1になるであろう)。

40

#### 【0116】

検出感度 - ナノ粒子アーキテクチャの決定 ナノ粒子アーキテクチャにおける予想シグナル対バックグラウンド比率の推定は、非標的種からの蛍光寄与がナノ粒子表面近く又はナノ粒子間で起こりうるので、さらに複雑である。ナノ粒子間に存在する種からの寄与

50

を最小にする励起幾何学を図 1 に示す、図 1 ではナノ粒子の局部プラズモン共鳴が、プリズムのエバネッセント波によって励起する。これらは、該表面の約 100 nm 内にランダムに拡散する非結合種のみが寄与を生じることを意味する。ナノ粒子アレイのシグナル対バックグラウンド比率は、 $M_{t.o.t} / (M_{t.o.t} + (1 - \quad))$  によって与えられる；それ故、非常に大きい総蛍光強化係数  $M_{t.o.t} \gg (1 - \quad) /$  に関しては、バックグラウンド単離は、ナノキャビティ・アーキテクチャと同じスケールである (scales the same as the nanocavity architectures)。ナノキャビティ・アーキテクチャに対して用いた同じ実験方法を、ナノ粒子アーキテクチャに対して繰り返す。

#### 【0117】

検出感度を 3 種類のアーキテクチャにわたって批判的に比較する。前述したように、ナノキャビティ・アーキテクチャは最大のバックグラウンド単離を有すると期待され、ブルズアイは、その大きい表面プラズモン強化と非常に低い充電比率のために、最大のシグナル対バックグラウンド比率を有する。これらのブルズアイ構造は、公平な実際の人々によって操作されうる、非常に高感度検出の実施のための最も有望なアーキテクチャである、その理由は、大きい表面プラズモン強度強化によって、各帯が  $M_{y.i.e.l.d} \sim 10$  によって与えられる収率強化の利益を保持する、大きなアレイへの効果的なスケールアップが可能になるからである。

#### 【0118】

他の 2 セットの研究も行なうことができる：(1) 単一塩基対不適合の識別、これは、ナノ構造アレイの温度がヘテロ二本鎖溶解温度近くまで上昇することを出いて、非特異的結合研究と同じ方法で行なわれる；及び(2) 発現分析で遭遇される状況に他の適切な結果を与えるために、60 塩基長さ(この場合、標的のボトム 20 塩基は抗 T3 に相補的である)の標的種と非標的種を用いた結合研究。

#### 【0119】

本明細書に含まれる説明は多くの詳細を含有するが、これらを本発明の範囲を限定するものと見なすべきではなく、単に、本発明による好ましい実施態様の一部を例示するものと見なすべきである。同様に、本発明の範囲から逸脱しない、本発明の他の実施態様も考案することができる。種々な実施態様からの特徴は組み合わせる用いることが可能である。それ故、本発明の範囲は、先行の記載によるよりもむしろ、特許請求の範囲とそれらの合法的な同等物によってのみ、表示され、限定される。請求項の意味及び範囲に入る、本明細書に開示したとおりの本発明への添加、削除及び変更の全ては、本発明に包含されることになる。

#### 【0120】

本明細書に引用した、刊行物、特許及び特許出願を含めた、全ての参考文献は、各参考文献が個別にかつ詳細に援用されると表示され、その全体で本明細書に陳述されたと同じ程度に、本明細書に援用される。本明細書で考察した参考文献は、本出願の出願日前の、それらの開示に関してのみ提供される。本明細書のいずれにも、先行発明に基づいて、このような開示を早める資格が発明者に与えられないことの承認として解釈されるものはない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0121】

【図 1】図 1 は、(a) ナノキャビティの周期的アレイ；(b) 環状波形格子によって囲まれた単一ナノキャビティの“ブルズアイ”構造；及び(c) ナノ粒子の周期的アレイ；を含む周期的金属ナノ構造アーキテクチャの例を概略的に示す(平面図及び断面図で)。

【図 2】図 2 は、(a) ランダム・ナノキャビティ・アレイの平面図；(b) 周期的ナノキャビティ・アレイの平面図；及び(c) 図 2 (b) の周期的ナノキャビティ・アレイの側面図；を概略的に示す。

【図 3】図 3 は、各ハイブリダイゼーション帯が金属ナノキャビティのアレイを包含するハイブリダイゼーション・アレイを例示する。二つのナノキャビティ実施態様も例示する：タイプ I、この場合には、プローブ分子がナノキャビティの底部に選択的に付着する、

10

20

30

40

50

及びタイプ I I、この場合には、プローブ分子がナノキャビティの側壁に選択的に付着する。 $\text{SiO}_2$ の薄層を付着させて、金属上面を被覆することによる金属表面の不動態化も、タイプ I I ナノキャビティに関して例示する。例示は、一定の縮尺ではない。

【図 4】図 4 は、リアルタイム・ハイブリダイゼーション実験に用いることができるマイクロ流路の例を示す。

【図 5】図 5 は、溶液中の T 3 とナノキャビティ内に固定化した抗 T 3 とのリアルタイム・ハイブリダイゼーションを例示するグラフである。

【図 6】図 6 は、キャプチャー分子と標的分子との結合をシミュレートする 2 区画モデルに関連した幾何学を概略的に示す。

【図 7】図 7 は、モデル結合 / 解離曲線である。

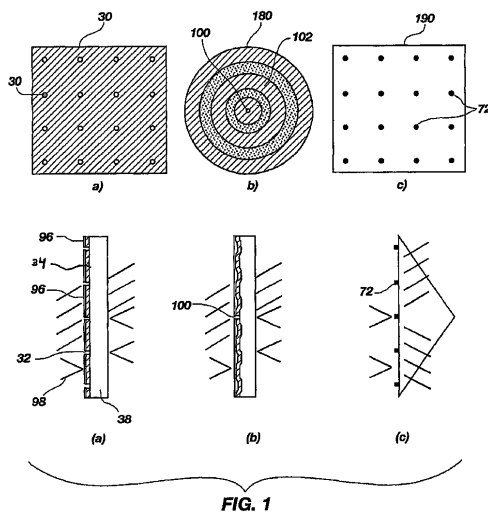
【図 8】図 8 は、検証研究のための  $3 \times 3$  ハイブリダイゼーション・アレイの個別検出帯のパターン化を例示する。

【図 9】図 9 は、方形格子の周期的ナノアパーチャ・アレイの走査電子顕微鏡検査 (SEM) イメージである。

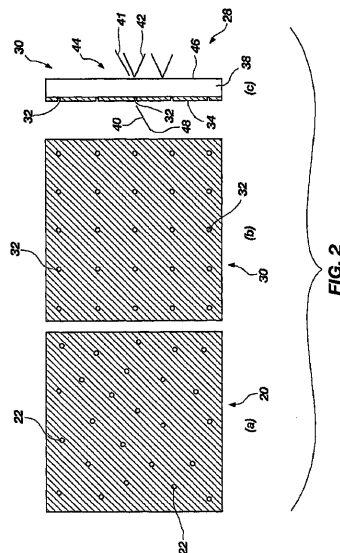
【図 10】図 10 は、リフトオフ方法によって電子ビーム・リソグラフィを介して作製された金属ナノ粒子アレイの SEM イメージである。

10

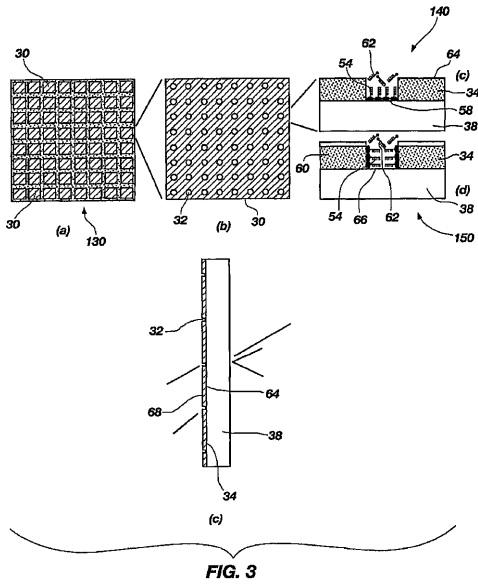
【図 1】



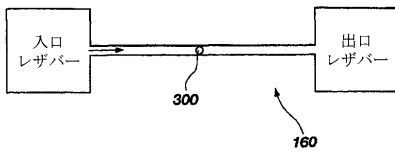
【図 2】



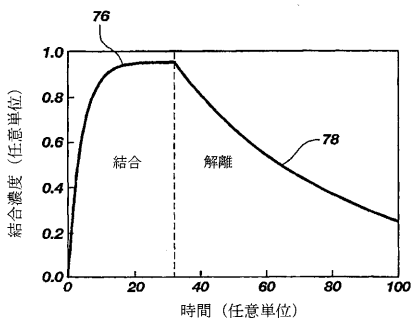
【図 3】



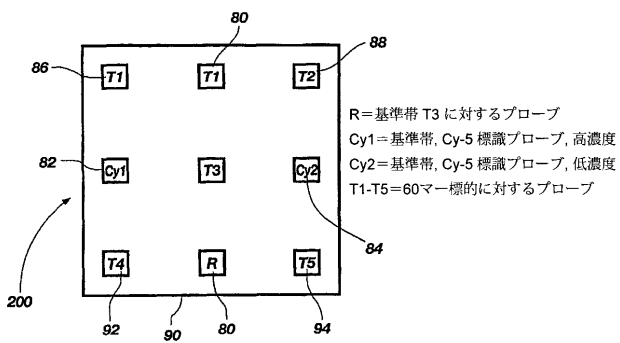
【図 4】



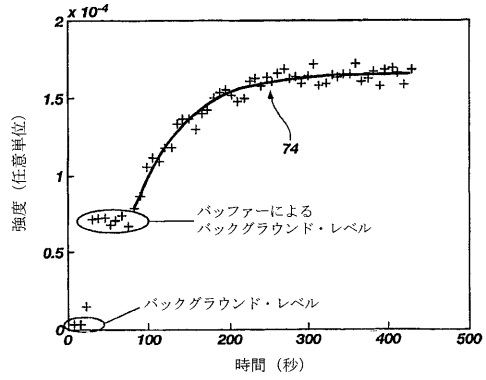
【図 7】



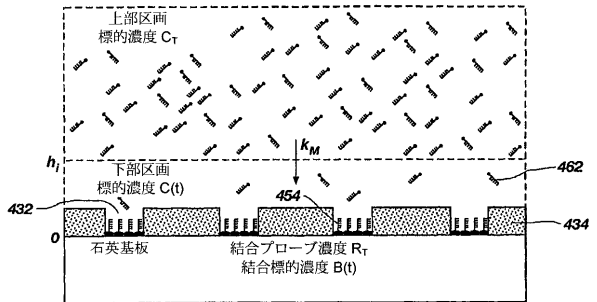
【図 8】



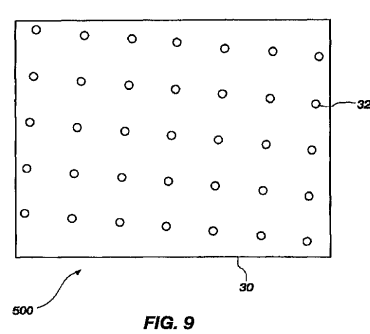
【図 5】



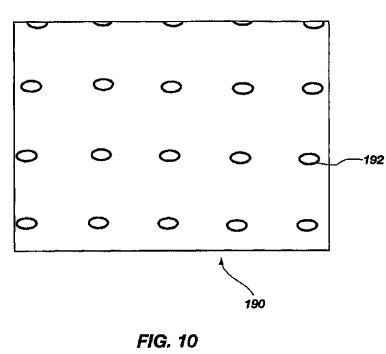
【図 6】



【図 9】



【図 10】



## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L,C,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 ブレア, スティーヴン・エム

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 2 1, ソルト・レイク・シティ, 3 4 3 4 イースト 7 5 9 0 サウス

(72)発明者 マーダヴィ, ファーハド

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 0 9 - 1 3 3 2, ソルト・レイク・シティ, エルム・アヴェニュー 2 5 5 5

(72)発明者 リウ, ヨンドン

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 0 8, ソルト・レイク・シティ, ユニバーシティ・ヴィレッジ 9 3 3

(72)発明者 ハーロン, ジェイムズ・エヌ

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 0 9, ソルト・レイク・シティ, サウス・プラトウ・ドライブ 2 9 6 5

(72)発明者 ナハタ, アジャイ

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 2 1, ソルト・レイク・シティ, ヘイヴェン・ブルック・サークル 6 2 9 6

F ターム(参考) 2G043 BA16 BA17 DA01 DA06 EA01 EA03 GA07 GB01 GB02 GB05

GB16 KA02 KA03 KA05