



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117616056 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 27

(21) 申请号 202280045978.2

(22) 申请日 2022.06.21

(30) 优先权数据

2021-107307 2021.06.29 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/024652 2022.06.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/276772 JA 2023.01.05

(71) 申请人 普和希控股公司

地址 日本国东京都

(72) 发明人 羽田圭吾

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

专利代理师 戴彬

(51) Int. Cl.

C08F 212/00 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

C08F 226/02 (2006.01)

C08F 220/00 (2006.01)

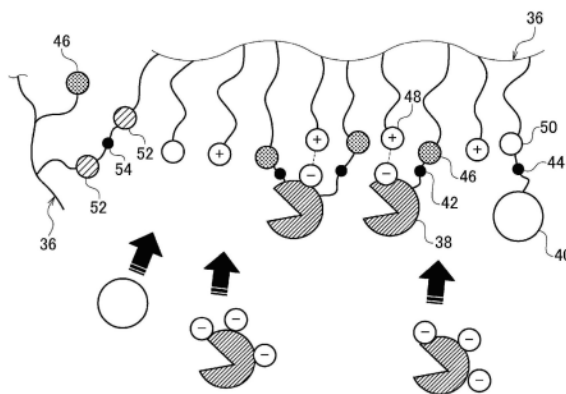
权利要求书3页 说明书17页 附图14页

(54) 发明名称

聚合物、试剂层及传感器

(57) 摘要

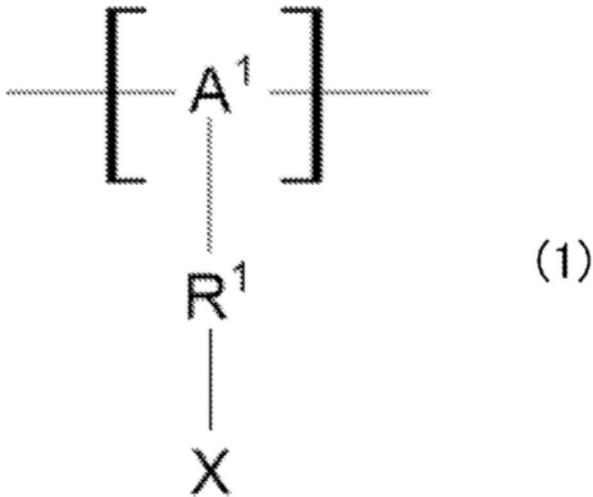
测定试样中的待分析物的传感器的试剂层(32)中含有的聚合物(36)具备:与作用于待分析物的蛋白质(38)共价结合的第1结合部位(46)和利用静电相互作用与蛋白质(38)结合的第2结合部位(48)。



1. 一种聚合物,是测定试样中的待分析物的传感器的试剂层中含有的聚合物,其具备:
与作用于所述待分析物的蛋白质共价结合的第1结合部位、和
利用静电相互作用与所述蛋白质结合的第2结合部位。

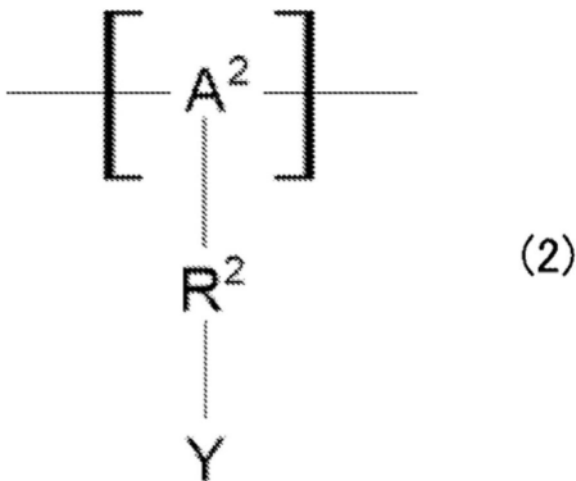
2. 根据权利要求1所述的聚合物,其包含式(1)所示的第1单体及式(2)所示的第2单体
作为结构单元,

式(1):



式(1)中, A^1 为任选具有取代基且任选在主链包含杂原子的烃基, R^1 为任选具有取代基的烃基、任选具有取代基的酰基、任选具有取代基的氧基酰基、或任选具有取代基的亚苯基, X 为能够与所述蛋白质共价结合的官能团,在第1单体为多个的情况下,各 A^1 、 R^1 及 X 任选相同或不同;

式(2):



式(2)中, A^2 为任选具有取代基且任选在主链包含杂原子的烃基, R^2 为任选具有取代基的烃基、任选具有取代基的酰基、任选具有取代基的氧基酰基、或任选具有取代基的亚苯基, Y 为能够利用静电相互作用与所述蛋白质结合的官能团,在第2单体为多个的情况下,各 A^2 、 R^2 及 Y 任选相同或不同。

3. 根据权利要求2所述的聚合物,其中,

官能团 X 为由选自胺、醇、酚、硫醇、羧酸、肼、烷氧基胺、羟基胺、咪唑、吡啶、酰叠氮、酰

卤、卤代烷、酸酐、醛、酮、烷基磺酸盐、马来酰亚胺、环氧化物、氮丙啶、异氰酸酯、异硫氰酸酯、酰亚胺酯、磺酰卤及活化酯中的至少一种衍生的基团，

官能团Y为由选自季铵、季磷、叔硫及芳香族阳离子中的至少一种衍生的阳离子基团、或由选自羧酸、磷酸及磺酸中的至少一种衍生的阴离子基团。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的聚合物，其中，
所述蛋白质为氧化还原酶。

5. 根据权利要求4所述的聚合物，其中，
所述聚合物具备与具有电子传递能力的氧化还原介体共价结合的第3结合部位。

6. 根据权利要求5所述的聚合物，其中，
所述第1结合部位及所述第3结合部位具有相同的官能团。

7. 一种试剂层，是测定试样中的待分析物的传感器的试剂层，其具备：
权利要求1至6中任一项所述的聚合物、和
结合于所述聚合物并且作用于所述待分析物的蛋白质。

8. 根据权利要求7所述的试剂层，其具备将所述蛋白质与所述第1结合部位结合的第1交联剂。

9. 根据权利要求7或8所述的试剂层，其中，
所述蛋白质为氧化还原酶，
所述聚合物具备与具有电子传递能力的氧化还原介体共价结合的第3结合部位，
所述试剂层具备结合于所述聚合物的所述氧化还原介体。

10. 根据权利要求9所述的试剂层，其具备将所述氧化还原介体与所述第3结合部位结合的第2交联剂。

11. 根据权利要求10所述的试剂层，其具备将所述氧化还原酶与所述第1结合部位结合的第1交联剂，

所述第1交联剂及所述第2交联剂为相同的交联剂。

12. 根据权利要求7至11中任一项所述的试剂层，其中，
所述试剂层具备多个所述聚合物，
各聚合物具有与其他的所述聚合物共价结合的第4结合部位，
所述试剂层具备将所述第4结合部位之间结合的第3交联剂。

13. 根据权利要求12所述的试剂层，其中，
所述蛋白质为氧化还原酶，
所述聚合物具备与具有电子传递能力的氧化还原介体共价结合的第3结合部位，
所述第1结合部位、所述第3结合部位及所述第4结合部位的至少两个具有相同的官能团。

14. 根据权利要求12或13所述的试剂层，其中，
所述蛋白质为氧化还原酶，
所述聚合物具备与具有电子传递能力的氧化还原介体共价结合的第3结合部位，
所述试剂层具备将所述氧化还原酶与所述第1结合部位结合的第1交联剂、和将所述氧化还原介体与所述第3结合部位结合的第2交联剂，

所述第1交联剂、所述第2交联剂及所述第3交联剂的至少两个为相同的交联剂。

15. 一种传感器,其具备:

包含工作电极及对电极的电极部、和

与上述工作电极接触地配置的权利要求7至14中任一项所述的试剂层。

16. 根据权利要求15所述的传感器,其具备覆盖上述试剂层的保护膜。

聚合物、试剂层及传感器

技术领域

[0001] 本申请涉及聚合物、试剂层及传感器。

背景技术

[0002] 以往,已知有使蛋白质作用于试样中的待分析物来测定待分析物的传感器。作为此种传感器,有使用了酶的电化学传感器。作为使用了酶的电化学传感器的代表例,可以举出血糖自我测定中使用的电化学葡萄糖生物传感器。电化学葡萄糖生物传感器中,使用葡萄糖氧化还原酶。

[0003] 近年来,正在开发连续地测定生物体内的待分析物的、嵌入型的电化学传感器。此种嵌入型的电化学传感器一般被嵌入生物体内数天~数周这样的长时间。因而,需要抑制氧化还原酶向传感器外部流出。针对于此,已知有通过将含有氧化还原酶的试剂层用保护膜覆盖来抑制氧化还原酶向传感器的外部流出的技术(例如参照专利文献1)。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:国际公开第2019/146788号

发明内容

[0007] 发明要解决的课题

[0008] 通过利用保护膜来抑制氧化还原酶的流出,可以抑制电化学传感器的耐久性、测定灵敏度降低、或生物体等受到负面的影响。另一方面,经常有想要进一步抑制电化学传感器的耐久性、测定灵敏度的降低的要求、想要进一步抑制生物体等所受到的负面的影响的要求。另外,在并非嵌入型的传感器、使用氧化还原酶以外的蛋白质的传感器中,也当然要求维持耐久性、测定灵敏度。因而,期望进一步抑制蛋白质向传感器外部的流出。

[0009] 本申请是鉴于这样的状况而完成的,其目的之一在于,提供一种抑制蛋白质向传感器外部的流出的技术。

[0010] 用于解决课题的手段

[0011] 为了解决上述课题,本申请的某个方式为测定试样中的待分析物的传感器的试剂层中含有的聚合物。该聚合物具备与作用于待分析物的蛋白质共价结合的第1结合部位、和利用静电相互作用与蛋白质结合的第2结合部位。

[0012] 另外,本申请的另一方式为测定试样中的待分析物的传感器的试剂层。该试剂层具备上述方式的聚合物和结合于聚合物并且作用于待分析物的蛋白质。

[0013] 另外,本申请的另一方式为传感器。该传感器具备包含工作电极及对电极的电极部、和与工作电极接触地配置的上述方式的试剂层。

[0014] 另外,将以上说明的构成要素的任意的组合、本申请的表达在方法、装置、系统等之间变换后的方式作为本申请的方式而言也是有效的。

[0015] 发明效果

[0016] 根据本申请,可以抑制蛋白质向传感器外部的流出。

附图说明

[0017] 图1(A)是表示实施方式的传感器的表面侧的图。图1(B)是表示实施方式的传感器的背面侧的图。

[0018] 图2(A)~图2(D)是表示传感器的制造工序的图。

[0019] 图3(A)~图3(D)是表示传感器的制造工序的图。

[0020] 图4(A)~图4(C)是表示传感器的制造工序的图。

[0021] 图5是沿着图1(A)中所示的A-A线的剖视图。

[0022] 图6(A)是沿着图5中所示的B-B线的剖视图。图6(B)是沿着图5中所示的C-C线的剖视图。

[0023] 图7是表示试剂层内的聚合物、蛋白质及氧化还原介体的状态的示意图。

[0024] 图8是表示能够共价结合的反应基团的组合的图。

[0025] 图9是用于说明传感器的测定原理的示意图。

[0026] 图10是表示聚合物A的聚合反应的图。

[0027] 图11是表示聚合物B的聚合反应的图。

[0028] 图12是表示聚合物C的聚合反应的图。

[0029] 图13是表示各介体结合聚合物的吸收光谱的图。

[0030] 图14是表示传感器的耐久性评价的结果的图。

[0031] 图15是表示聚合物E的聚合反应的图。

[0032] 图16是表示聚合物F的聚合反应的图。

具体实施方式

[0033] 以下,对本申请基于合适的实施方式一边参照附图一边进行说明。实施方式并不限定本申请而是例示,实施方式中记述的所有特征、其组合不一定是本申请的本质性的内容。对于各附图中所示的相同或同等的构成要素、构件、处理赋予相同的符号,适当地省略重复的说明。另外,各图中所示的各部的比例尺、形状为了使说明容易而权宜性地设定,只要没有特别提及,就不应限定性地解释。另外,在本说明书或权利要求中使用“第1”、“第2”等术语的情况下,只要没有特别提及,则该术语并不表示任何的顺序、重要度,而是用于区别某个构成与其他构成。另外,在各图中对在说明实施方式的方面不重要的构件的一部分加以省略地表示。

[0034] 图1(A)是表示实施方式的传感器1的表面侧的图。图1(B)是表示实施方式的传感器1的背面侧的图。本实施方式中,所谓传感器1的表面,是配置工作电极26及参比电极28的一侧的面。所谓传感器1的背面,是配置对电极30的一侧的面。需要说明的是,传感器1的表背没有特别限定。

[0035] 本实施方式的传感器1为用于测定试样中的待分析物的传感器,例如为生物传感器。作为一例的传感器1为电化学传感器,具有传感部2和端子部4。传感部2被插入生物体(例如人体)。端子部4将安装于生物体的表面的未图示的电路部与传感部2电连接。传感部2经由端子部4向电路部传送电信号。

[0036] 通过将传感部2维持为插入生物体的状态,可以连续地测定作为试样的血液等中的作为待分析物的葡萄糖等的存在、浓度。需要说明的是,本实施方式中,虽然以嵌入型的电化学传感器为传感器1的例子举出而进行说明,然而传感器1也可以是非嵌入型,还可以是电化学式以外的测定样式。另外,试样、待分析物的种类没有特别限定。试样例如也可以为培养基等。另外,作为待分析物,可以例示出血红蛋白;糖化血红蛋白;谷氨酰胺、谷氨酸等氨基酸;果糖基赖氨酸、果糖基缬氨酸等糖化氨基酸;果糖基缬氨酰基组氨酸等糖化肽;糖化清蛋白;葡萄糖等糖类;维生素C等维生素类;醇类;胆固醇;乳酸;丙酮酸;酮体(3-羟基丁酸)等。

[0037] 传感部2由保护膜6覆盖。保护膜6至少覆盖后述的试剂层。保护膜6抑制试剂层中含有的物质(例如氧化还原酶、氧化还原介体)向保护膜6外的漏出。另外,保护膜6具有使存在于保护膜6外的待分析物能够向保护膜6内透过的孔。嵌入型的生物传感器中,传感部2被插入生物体内。因此,保护膜6优选难以吸附蛋白质、细胞,一般由具有此种性质的聚合物构成。作为能够构成保护膜6的聚合物,例如可以举出甲基丙烯酸甲酯与甲基丙烯酸羟乙酯的共聚物、甲基丙烯酸丁酯与甲基丙烯酸羟乙酯的共聚物、聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱-共聚-甲基丙烯酸正丁酯)等。需要说明的是,也可以使用具有与这些所例示的聚合物同样的主链的(甲基)丙烯酸酯系化合物。

[0038] 在端子部4的表面,设有参比电极连接端子8和工作电极连接端子10。在端子部4的背面,设有对电极连接端子12。端子部4的除了参比电极连接端子8、工作电极连接端子10及对电极连接端子12以外的部分由绝缘性的抗蚀剂膜14覆盖。

[0039] 图2(A)~图2(D)、图3(A)~图3(D)及图4(A)~图4(C)是表示传感器1的制造工序的图。首先,如图2(A)及图2(C)所示,形成绝缘基板16。绝缘基板16例如由聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚醚酮、聚碳酸酯、聚酰亚胺、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚甲醛、单体浇铸尼龙、聚对苯二甲酸丁二醇酯、甲基丙烯酸类树脂、ABS树脂等树脂材料、或玻璃材料构成。优选绝缘基板16由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成。

[0040] 此后,如图2(B)所示,在绝缘基板16的表面形成导电性薄膜18。另外,如图2(D)所示,在绝缘基板16的背面形成导电性薄膜18。导电性薄膜18可以通过使用溅射法、蒸镀法、离子镀法、丝网印刷法等将金(Au)、铂(Pt)、钯(Pd)、铱(Ir)、碳(C)等导电性材料在绝缘基板16的两面成膜来形成。

[0041] 然后,如图3(A)所示,表面侧的导电性薄膜18被利用激光描画进行分割,形成参比电极导体20和工作电极导体22。此后,如图3(B)所示,利用丝网印刷法等,在表面侧的导电性薄膜18上形成抗蚀剂膜14。参比电极导体20中的传感部2中含有的一部分和端子部4中含有的一部分没有被层叠抗蚀剂膜14而是露出。由此,形成参比电极形成区域24及参比电极连接端子8。另外,工作电极导体22中的传感部2中含有的一部分和端子部4中含有的一部分没有被层叠抗蚀剂膜14而是露出。由此,形成工作电极26及工作电极连接端子10。接下来,如图3(C)所示,利用丝网印刷法、喷墨印刷法等,在参比电极形成区域24形成银/氯化银(Ag/AgCl)等的膜,从而形成参比电极28。

[0042] 另外,如图3(D)所示,利用丝网印刷法等,在背面侧的导电性薄膜18上形成抗蚀剂膜14。背面侧的导电性薄膜18中的传感部2中含有的一部分和端子部4中含有的一部分没有被层叠抗蚀剂膜14而是露出。由此,形成对电极30及对电极连接端子12。

[0043] 然后,如图4(A)所示,在工作电极26上涂布试剂液,经过干燥而形成试剂层32。因而,试剂层32被与工作电极26接触地配置。关于试剂层32的组成,后面将详细说明。其后,如图4(B)及图4(C)所示,相当于传感部2的部分被浸渍于保护膜用聚合物溶液中,经过干燥而形成保护膜6。由此,试剂层32由保护膜6覆盖。本实施方式的保护膜6将整个传感部2覆盖。

[0044] 利用以上的工序,得到具有由保护膜6覆盖的传感部2和没有由保护膜6覆盖而露出参比电极连接端子8、工作电极连接端子10及对电极连接端子12的端子部4的传感器1。

[0045] 图5是沿着图1(A)所示的A-A线的剖视图。需要说明的是,图5中,仅图示出传感部2。图6(A)是沿着图5所示的B-B线的剖视图。图6(B)是沿着图5所示的C-C线的剖视图。

[0046] 如图5及图6(A)所示,在传感部2的前端区域,在中央配置有绝缘基板16。而且,在绝缘基板16的表面侧,依次层叠有工作电极26及试剂层32。另外,在绝缘基板16的背面侧,层叠有对电极30。而且,绝缘基板16、工作电极26、试剂层32及对电极30由保护膜6覆盖。

[0047] 如图5及图6(B)所示,相对于传感部2的前端区域在端子部4侧的区域,在中央配置有绝缘基板16。而且,在绝缘基板16的表面侧,层叠有参比电极导体20及工作电极导体22,在其上层叠有抗蚀剂膜14。另外,在参比电极导体20的表面侧,层叠有参比电极28。另外,在绝缘基板16的背面侧,依次层叠有导电性薄膜18及抗蚀剂膜14。而且,绝缘基板16、参比电极导体20、工作电极导体22、表面侧的抗蚀剂膜14、参比电极28、导电性薄膜18及背面侧的抗蚀剂膜14由保护膜6覆盖。

[0048] 工作电极26、参比电极28及对电极30构成电极部34。因而,本实施方式的电极部34具有3电极式的电极结构。需要说明的是,电极部34只要包含工作电极26及对电极30即可,也可以是仅为工作电极26及对电极30的2电极式。

[0049] 接下来,对试剂层32进行详细说明。图7是表示试剂层32内的聚合物36、蛋白质38及氧化还原介体40的状态的示意图。如图7所示,试剂层32具备聚合物36和蛋白质38。作为蛋白质38,可以例示出氧化还原酶、抗体(免疫球蛋白)等。本实施方式中,蛋白质38为氧化还原酶。而且,本实施方式中的试剂层32具备具有电子传递能力的氧化还原介体40。此外,试剂层32具备第1交联剂42、第2交联剂44和第3交联剂54。需要说明的是,试剂层32也可以还包含碳粒子等导电性粒子、缓冲液成分等其他成分。

[0050] 聚合物36具备与蛋白质38共价结合的第1结合部位46和利用静电相互作用与蛋白质38结合的第2结合部位48。通过将聚合物36与蛋白质38利用共价结合及静电相互作用彼此结合,可以形成聚合物36与蛋白质38牢固地结合了的高分子量的复合体。由此,可以抑制蛋白质38透过保护膜6向传感器1的外部流出。需要说明的是,图7中,第2结合部位48具有正的电荷,蛋白质38具有负的电荷,然而也可以相反。

[0051] 另外,本实施方式中,第1交联剂42介于蛋白质38与第1结合部位46之间,将两者结合。由此,可以将复合体进一步高分子量化,因此可以进一步抑制蛋白质38的流出。需要说明的是,蛋白质38与第1结合部位46可以不经由第1交联剂42地直接共价结合。

[0052] 另外,聚合物36具备与氧化还原介体40共价结合的第3结合部位50。通过将聚合物36与氧化还原介体40利用共价结合彼此结合,可以形成聚合物36与氧化还原介体40结合了的高分子量的复合体。由此,可以抑制氧化还原介体40透过保护膜6向传感器1的外部流出。

[0053] 另外,本实施方式中,第2交联剂44介于氧化还原介体40与第3结合部位50之间,将两者结合。由此,可以将复合体进一步高分子量化,因此可以进一步抑制氧化还原介体40的

流出。需要说明的是,氧化还原介体40与第3结合部位50可以不经由第2交联剂44地直接共价结合。

[0054] 另外,通过在聚合物36结合作为蛋白质38的氧化还原酶和氧化还原介体40,可以拉近氧化还原酶与氧化还原介体40的距离。由此,可以提高试剂层32的响应性。另外,与聚合物36仅结合蛋白质38及氧化还原介体40的一者的情况相比,可以将复合体进一步高分子量化。由此,可以进一步抑制蛋白质38及氧化还原介体40的流出。

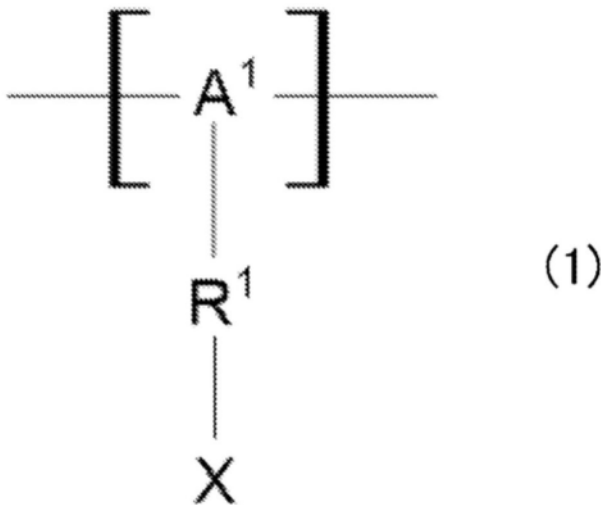
[0055] 另外,在试剂层32中,包含多个聚合物36。试剂层32中含有的多个聚合物36可以仅为一种,也可以为多种的组合。而且,各聚合物36具有与其他的聚合物36共价结合的第4结合部位52。通过将第4结合部位52间共价结合,可以将各聚合物36彼此结合。另外,本实施方式中,第3交联剂54介于两个第4结合部位52之间,将两者结合。通过将聚合物36间彼此结合,可以将复合体更进一步高分子量化。另外,通过将第3交联剂54介于聚合物36间而将两者结合,可以将复合体更进一步高分子量化。由此,可以进一步抑制蛋白质38及氧化还原介体40的流出。需要说明的是,第4结合部位52间可以不经由第3交联剂54地直接共价结合。

[0056] 以下,对试剂层32中含有的各成分进行详细说明。

[0057] (聚合物36)

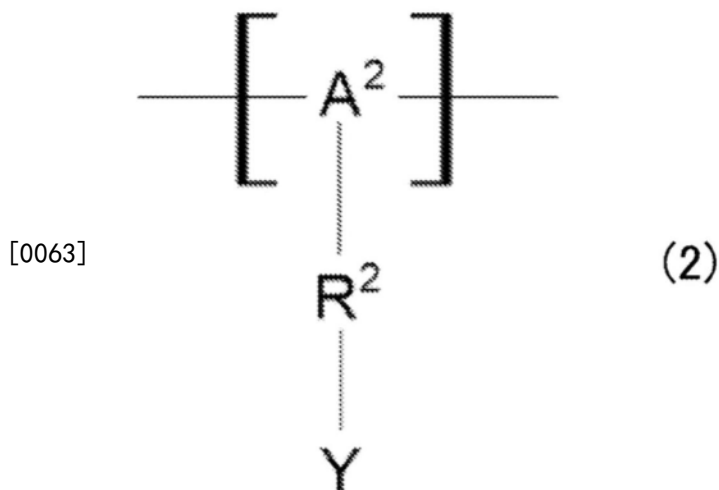
[0058] 本实施方式的聚合物36包含下述式(1)所示的第1单体以及下述式(2)所示的第2单体作为结构单元。

[0059] [化1]



[0061] [式(1)中,A¹为可以具有取代基且可以在主链包含杂原子的烃基,R¹为可以具有取代基的烃基、可以具有取代基的酰基、可以具有取代基的氧基酰基、或可以具有取代基的亚苯基,X为能够与蛋白质38共价结合的官能团,在第1单体为多个的情况下,各A¹、R¹及X可以相同也可以不同]

[0062] [化2]



[0064] [式(2)中, A^2 为可以具有取代基且可以在主链包含杂原子的烃基, R^2 为可以具有取代基的烃基、可以具有取代基的酰基、可以具有取代基的氧基酰基、或可以具有取代基的亚苯基, Y 为能够利用静电相互作用与蛋白质38结合的官能团, 在第2单体为多个的情况下, 各 A^2 、 R^2 及 Y 可以相同也可以不同]

[0065] A^1 及 A^2 可以在主链包含的杂原子各自独立地例如为氧(O)、氮(N)、硅(Si)。另外, 作为 A^1 , 可以例示出 $-\text{CH}_2-\text{CHR}^1-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)\text{R}^1-$ 等。作为 A^2 , 可以例示出 $-\text{CH}_2-\text{CHR}^2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)\text{R}^2-$ 等。作为 R^1 及 R^2 , 可以各自独立地例示出 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-$ 等。 $-\text{C}_6\text{H}_5-$ 为苯环。

[0066] 官能团X优选为由选自胺、醇、酚、硫醇、羧酸、肼、烷氧基胺、羟基胺、咪唑、吡啶、酰叠氮、酰卤、卤代烷、酸酐、醛、酮、烷基磺酸盐、马来酰亚胺、环氧化物、氮丙啶、异氰酸酯、异硫氰酸酯、酰亚胺酯、磺酰卤及活化酯中的至少一种衍生的基团。作为活化酯, 可以例示出由包含磺基、硝基或卤基的吸电子基团取代了的琥珀酰亚胺基酯、苯并三唑酯或芳基酯、或具有碳二亚胺基的羧酸酯。

[0067] 至少一部分的官能团X构成第1结合部位46。该情况下, 官能团X的种类可以根据作为结合对象的蛋白质38的种类来恰当地选择。图8是表示能够共价结合的反应基团的组合的图。第1结合部位46和蛋白质38只要任意一者具有图8所示的第1反应基团、另一者具有图8所示的第2反应基团, 就可以彼此共价结合。另外, 在第1交联剂42介于第1结合部位46与蛋白质38之间的情况下, 只要第1交联剂42及第1结合部位46的一者具有第1反应基团、另一者具有第2反应基团并且第1交联剂42及蛋白质38的一者具有第1反应基团、另一者具有第2反应基团即可。

[0068] 优选官能团X为由选自胺、硫醇、羧酸、咪唑及吡啶中的至少一种衍生的基团。由此, 能够选择更加易于获取的交联剂作为第1交联剂42, 因此可以更加简便地实现经由第1交联剂42的聚合物36与蛋白质38的共价结合。另外, 在经由或不经由第1交联剂42的聚合物36与蛋白质38的交联反应中, 可以使温度、pH等反应条件为比较温和的条件。由此, 可以抑制蛋白质38的失活。

[0069] 另外, 至少一部分的官能团X构成第3结合部位50。该情况下, 官能团X的种类可以根据作为结合对象的氧化还原介体40的种类来恰当地选择。即, 第3结合部位50和氧化还原介体40只要任意一者具有第1反应基团、另一者具有第2反应基团, 就可以彼此共价结合。另

外,在第2交联剂44介于第3结合部位50与氧化还原介体40之间的情况下,只要第2交联剂44及第3结合部位50的一者具有第1反应基团、另一者具有第2反应基团并且第2交联剂44及氧化还原介体40的一者具有第1反应基团、另一者具有第2反应基团即可。

[0070] 第1结合部位46及第3结合部位50优选具有相同的官能团。即,优选相同种类的官能团X构成第1结合部位46及第3结合部位50两者。由此,可以利用一种第1单体来实现与蛋白质38的共价结合和与氧化还原介体40的共价结合。从而可以削减构成聚合物36的单体的种类,可以实现聚合物36的合成方法的简化。

[0071] 另外,至少一部分的官能团X构成第4结合部位52。该情况下,官能团X的种类可以根据作为结合对象的其他的聚合物36的第4结合部位52的种类来恰当地选择。即,在两个聚合物36的第4结合部位52,只要任意一者具有第1反应基团、另一者具有第2反应基团,就可以彼此共价结合。另外,在第3交联剂54介于两个第4结合部位52之间的情况下,只要在第3交联剂54与各第4结合部位52之间满足第1反应基团与第2反应基团的组合条件即可。

[0072] 第1结合部位46、第3结合部位50及第4结合部位52优选至少两个具有相同的官能团,更优选三个具有相同的官能团。即,优选相同种类的官能团X构成第1结合部位46、第3结合部位50及第4结合部位52中的至少两个。由此,可以利用更少种类的第1单体来实现与蛋白质38的共价结合、与氧化还原介体40的共价结合以及与其他聚合物36的共价结合。从而可以削减构成聚合物36的单体的种类,可以实现聚合物36的合成方法的简化。

[0073] 官能团Y优选为由选自季铵、季磷、叔硫及芳香族阳离子中的至少一种衍生的阳离子基团、或由选自羧酸、磷酸及磺酸中的至少一种衍生的阴离子基团。

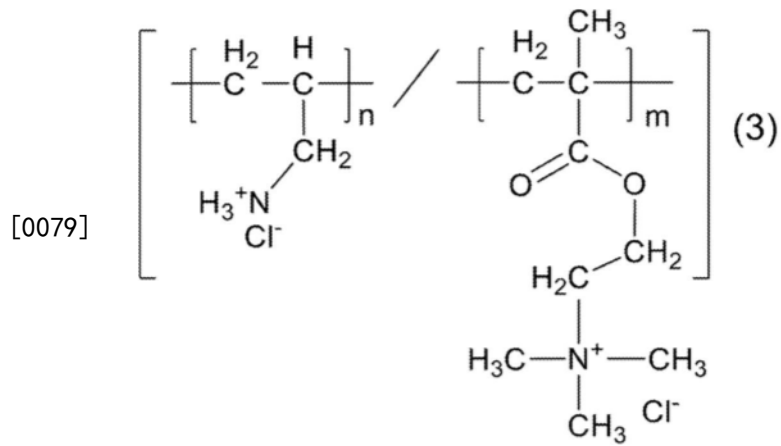
[0074] 季铵具有在氮原子键合有4个有机取代基 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 的结构。季磷具有在磷原子键合有4个有机取代基 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 的结构。叔硫具有在硫原子键合有3个有机取代基 R^2 、 R^3 、 R^4 的结构。 R^2 如上所示。 $R^3 \sim R^5$ 例如为可以具有取代基的 C_{1-6} 的直链或支链的饱和或不饱和的烃基、可以具有取代基的酰基、可以具有取代基的烷氧基、可以具有取代基的苯基, $R^3 \sim R^5$ 可以相同也可以不同。

[0075] 作为芳香族阳离子,可以例示出咪唑鎓、噁唑鎓、吡嗪鎓、吡啶鎓、哒嗪鎓、吡咯烷鎓、吡啶鎓、哌啶鎓、噻唑鎓及三唑鎓。

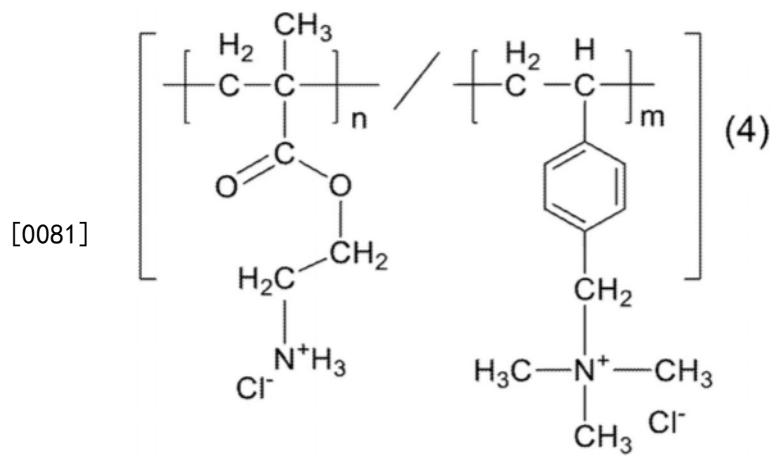
[0076] 官能团Y构成第2结合部位48。官能团Y的种类可以根据作为结合对象的蛋白质38的种类来恰当地选择。第2结合部位48与蛋白质38只要具有相反的电荷,就可以利用静电相互作用来彼此结合。作为一例的官能团Y为与官能团X不同的基团。另外,优选官能团Y为阳离子基团。在蛋白质38为氧化还原酶的情况下,在传感器1被主要使用的中性附近的条件下,一般的氧化还原酶大多具有负的电荷。因此,通过将官能团Y设为阳离子基团,可以更加简便地实现聚合物36与蛋白质38的基于静电相互作用的结合。

[0077] 作为聚合物36的具体例,可以例示出下述式(3)~式(7)所示的聚合物。式(3)~式(6)中的m及n和式(7)中的1、m及n表示各单体的摩尔比。各单体的摩尔比可以恰当地设定。另外,式(3)~式(7)中,作为相反离子的一例示出 Cl^- 。

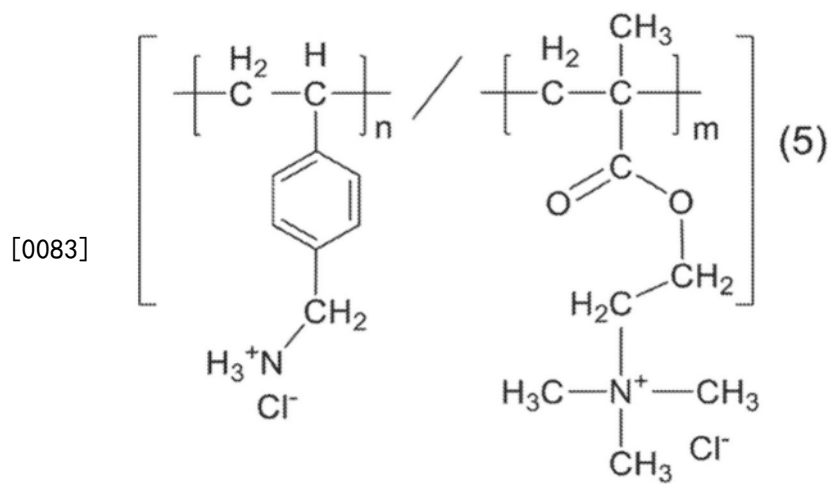
[0078] [化3]



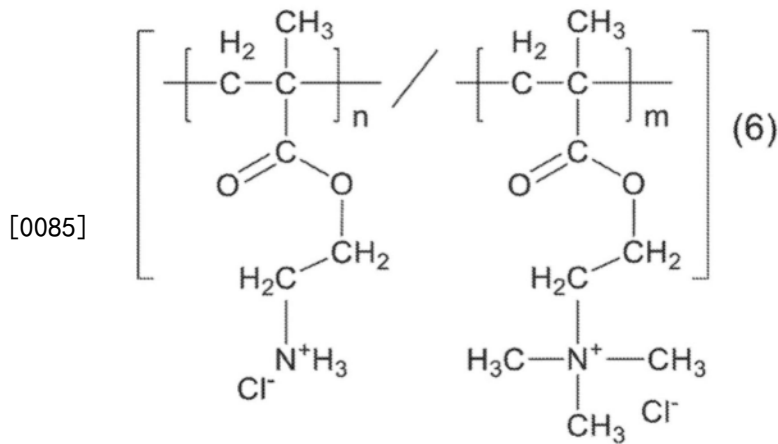
[0080] [化4]



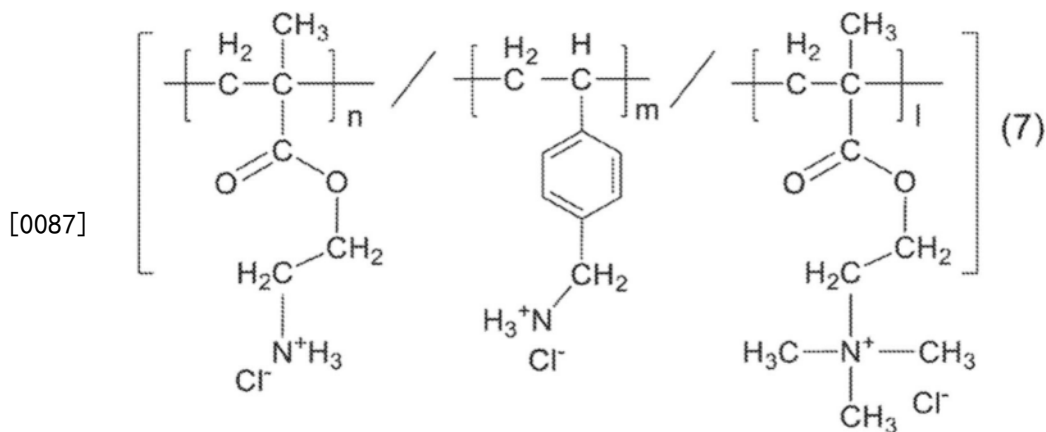
[0082] [化5]



[0084] [化6]



[0086] [化7]



[0088] (蛋白质38)

[0089] 蛋白质38结合于聚合物36的第1结合部位46及第2结合部位48并且作用于待分析物。如上所述,作为蛋白质38可以例示出氧化还原酶、抗体(免疫球蛋白)等。本实施方式的所谓氧化还原酶,是指可以将待分析物氧化或脱氢化的酶。作为氧化还原酶,可以例示出葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶、胆固醇氧化酶、氨基酸氧化酶、谷氨酸氧化酶、果糖基氨基酸氧化酶、醇氧化酶、抗坏血酸氧化酶、果糖基肽氧化酶、葡萄糖脱氢酶、乳酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、氨基酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、3-羟基丁酸脱氢酶、醇脱氢酶等。氧化还原酶根据需要可以组合多种。

[0090] 在蛋白质38为氧化还原酶的情况下,典型地,氧化还原酶所具有的氨基与第1结合部位46或第1交联剂42共价结合。另外,也可能有氧化还原酶所具有的硫醇基、羧基等与第1结合部位46或第1交联剂42共价结合的情况。氧化还原酶的配合量例如在每1个传感器中、或每1次的测定中优选为0.01~100U(单元),更优选为0.05~50U,进一步优选为0.1~10U。

[0091] 另外,在蛋白质38与第2结合部位48的结合部位具有正的电荷的情况下,优选等电点为使用环境的pH以下。另外,在蛋白质38与第2结合部位48的结合部位具有负的电荷的情况下,优选等电点为使用环境的pH以上。蛋白质38的使用环境至少是指试剂液中。优选蛋白质38的使用环境意指试剂液中和测定对象试样中两者。作为一例,在与第2结合部位48的结合部位具有正的电荷的情况下,蛋白质38的等电点优选为pH9以下,更优选为pH7.4以下,进一步优选为pH5.5以下。另外,在与第2结合部位48的结合部位具有负的电荷的情况下,蛋白质38的等电点优选为pH5.5以上,更优选为pH7.4以上,进一步优选为pH9以上。

[0092] 作为蛋白质38的氧化还原酶优选为辅酶结合型酶。作为辅酶,可以例示出吡咯并喹啉醌(PQQ)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、黄素单核苷酸(FMN)、硫胺素焦磷酸(TPP)、辅酶A(CoA)等。

[0093] 例如,在待分析物为葡萄糖的情况下,氧化还原酶成为葡萄糖氧化酶或葡萄糖脱氢酶(GDH)。作为辅酶结合型的葡萄糖脱氢酶,可以例示出吡咯并喹啉醌(PQQ)结合型GDH、黄素腺嘌呤核苷酸(FAD)结合型GDH。另外,若考虑生物体内的麦芽糖的影响,则GDH优选在将对于葡萄糖的酶活性设为100%时的对于麦芽糖的酶活性为5%以下,更优选为3%以下。作为具有此种酶活性的酶,可以例示出FAD结合型GDH。另外,作为此种FAD结合型GDH,可以例示出曲霉属(米曲霉、土曲霉)来源、毛霉属来源的GDH。

[0094] (氧化还原介体40)

[0095] 氧化还原介体40可以结合于聚合物36的第3结合部位50并且可逆地成为氧化体及还原体,介导物质间的电子的移动。作为氧化还原介体40,可以例示出钼络合物、钕络合物、铁络合物等金属络合物类;苯醌、萘醌、菲醌、菲咯啉醌、蒽醌以及它们的衍生物等醌化合物;吩嗪化合物;紫晶化合物;吩噻嗪化合物;苯酚化合物等。氧化还原介体40根据需要可以组合多种。

[0096] 作为氧化还原介体40的具体例,可以举出作为选自铁氰化钾;六氨合钒;二茂铁;对苯二醌;2-甲基-1,4-苯醌;1,2-萘醌-4-磺酸盐;9,10-菲醌-2-磺酸盐;9,10-菲醌-2,7-二磺酸盐;1,10-菲咯啉-5,6-二酮;蒽醌-2-磺酸盐;1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸甲酯盐、1-甲氧基-5-乙基吩嗪鎓硫酸乙酯盐等吩嗪衍生物;甲基紫晶;苜蓿紫晶;亚甲基绿;2-氨基苯酚;2-氨基-4-甲基苯酚;以及2,4-二氨基苯酚中的一种以上的化合物的衍生物、且具有能够结合于聚合物36的官能团(图8所示的第1反应基团或第2反应基团)的衍生物。作为上述的盐(磺酸盐、二磺酸盐),可以例示出钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、锂盐等。

[0097] 氧化还原介体40的配合量例如在每1个传感器中、或每1次的测定中优选为0.1pmol~1000 μ mol,更优选为5pmol~250 μ mol,进一步优选为100pmol~50 μ mol。

[0098] 氧化还原介体40具有与第3结合部位50或第2交联剂44的结合部位。如上所述,氧化还原介体40的结合部位具有第1反应基团及第2反应基团当中的成为第3结合部位50或第2交联剂44所具有的反应基团的结合对象的反应基团。

[0099] (第1交联剂42、第2交联剂44及第3交联剂54)

[0100] 作为第1交联剂42、第2交联剂44及第3交联剂54,可以例示出选自戊二醛;琥珀酸二琥珀酰亚胺酯(Disuccinimidyl Succinate)、辛二酸二(3-磺基-N-琥珀酰亚胺)酯二钠盐(Bis(3-sulfo-N-succinimidyl)Suberate Disodium Salt)、4,7,10,13,16-五氧杂十九烷二酸双(N-琥珀酰亚胺基)酯(Bis(NHS)PEG5)等在两个末端具有NHS酯的化合物;聚乙二醇二缩水甘油基醚(Poly(ethylene glycol)diglycidyl ether)、聚丙二醇二缩水甘油基醚(Poly(propylene glycol)diglycidyl ether)、1,4-丁二醇二缩水甘油基醚(1,4-Butanediol diglycidyl ether)等在两个末端具有环氧基的化合物;1,2-双(马来酰亚胺)乙烷(1,2-Bis(maleimido)ethane)、1,11-双马来酰亚胺三乙二醇(1,11-bismaleimido-triethyleneglycol)等在两个末端具有马来酰亚胺基的化合物;1,2-双(2-氨基乙氧基)乙烷(1,2-Bis(2-aminoethoxy)ethane)等在两个末端具有氨基的化合物;马来酰亚胺-PEG2-琥珀酰亚胺基酯(Maleimide-PEG2-NHS Ester)、氨基-PEG6-羧酸(Amino-PEG6-carboxylic

Acid)的两个末端为不同的官能团的化合物;4臂-PEG10K-琥珀酰亚胺戊二酸酯(4arm-PEG10K-Succinimidyl Glutarate)、4臂-PEG10K-马来酰亚胺(4arm-PEG10K-Maleimide)、8臂-PEG10K-琥珀酰亚胺丁二酸酯(8arm-PEG10K-Succinimidyl Succinate)等具有支链的化合物中的一种以上。

[0101] 在试剂层32中含有第1交联剂42及第2交联剂44这两种的情况下,第1交联剂42及第2交联剂44优选为相同种类的交联剂。另外,在试剂层32中含有第1交联剂42及第3交联剂54这两种的情况下,第1交联剂42及第3交联剂54优选为相同种类的交联剂。另外,在试剂层32中含有第2交联剂44及第3交联剂54这两种的情况下,第2交联剂44及第3交联剂54优选为相同种类的交联剂。另外,在试剂层32中含有第1交联剂42、第2交联剂44及第3交联剂54这三种的情况下,第1交联剂42、第2交联剂44及第3交联剂54优选至少两种为相同的交联剂,更优选三种为相同的交联剂。由此,可以削减交联剂的种类,因此可以实现试剂层32的制备方法的简化。

[0102] 作为一例的试剂层32具备具有第1结合部位46、第2结合部位48、第3结合部位50及第4结合部位52的聚合物36、蛋白质38、氧化还原介体40、第1交联剂42和第3交联剂54。第1结合部位46、第3结合部位50及第4结合部位52的至少两个具有相同的官能团。蛋白质38经由第1交联剂42结合于第1结合部位46。另外,蛋白质38结合于第2结合部位48。氧化还原介体40不经由第2交联剂44地直接结合于第3结合部位50。两个聚合物36的第4结合部位52间经由第3交联剂54结合。而且,第1交联剂42与第3交联剂54为相同的交联剂。

[0103] 接下来,对基于传感器1的待分析物的测定原理进行说明。图9是用于说明传感器1的测定原理的示意图。此处作为一例,对传感器1为电化学传感器、待分析物为葡萄糖、蛋白质38为葡萄糖脱氢酶(GDH)的情况进行说明。

[0104] 首先,血液中、皮下间质液中的葡萄糖透过保护膜6到达试剂层32。然后,葡萄糖由葡萄糖脱氢酶氧化,生成葡萄糖内酯。另外,与此同时氧化还原介体40被还原,氧化体(M(Ox))成为还原体(M(Red))。而且,氧化还原介体40的还原体在工作电极26的表面被氧化,还原体(M(Red))成为氧化体(M(Ox)),同时产生电子。该电子被交接到工作电极26,作为电流值进行测定。

[0105] 如上说明所示,本实施方式的聚合物36利用基于第1结合部位46的共价结合和基于第2结合部位48的静电相互作用将蛋白质38结合。由此,可以抑制蛋白质38向传感器外部的流出。从而可以进一步抑制传感器1的耐久性、测定灵敏度的降低。另外,可以进一步抑制生物体等所受到的负面的影响。另外,聚合物36利用基于第3结合部位50的共价结合将氧化还原介体40结合。由此,可以抑制氧化还原介体40向传感器外部的流出。从而可以进一步抑制传感器1的耐久性、测定灵敏度的降低,另外可以进一步抑制生物体等所受到的负面的影响。另外,聚合物36利用基于第4结合部位52的共价结合与其他的聚合物36结合。由此,可以更进一步抑制传感器1的耐久性、测定灵敏度的降低,另外可以更进一步抑制生物体等所受到的负面的影响。

[0106] 此外,在蛋白质38与第1结合部位46之间夹设有第1交联剂42。另外,在氧化还原介体40与第3结合部位50之间夹设有第2交联剂44。另外,在两个第4结合部位52之间夹设有第3交联剂54。利用这些设置,可以进一步将聚合物36、蛋白质38及氧化还原介体40的复合体高分子量化。从而可以进一步抑制蛋白质38及氧化还原介体40向传感器外部的流出。

[0107] 以上,对本申请的实施方式进行了详细说明。前述的实施方式只不过是示出实施本申请时的具体例的实施方式。实施方式的内容并不限定本申请的技术范围,可以在权利要求的范围中规定的不脱离发明的思想的范围中进行构成要素的变更、追加、删除等大量的设计变更。施加了设计变更的新的实施方式兼具所组合的实施方式及变形各自的效果。前述的实施方式中,关于能够进行此种设计变更的内容,赋予“本实施方式的”、“本实施方式中”等表述来进行强调,然而即使是没有此种表述的内容也容许设计变更。以上的构成要素的任意的组合也作为本申请的方式有效。附加在图的剖面中的影线并不限定附加有影线的对象的材质。

[0108] 需要说明的是,实施方式可以由以下记载的项目来确定。

[0109] (项目1)

[0110] 一种聚合物(36),是测定试样中的待分析物的传感器(1)的试剂层(32)中含有的聚合物(36),其具备:

[0111] 与作用于待分析物的蛋白质(38)共价结合的第1结合部位(46)、和

[0112] 利用静电相互作用与蛋白质(38)结合的第2结合部位(48)。

[0113] (项目2)

[0114] 根据项目1中记载的聚合物(36),其包含上述式(1)所示的第1单体以及上述式(2)所示的第2单体作为结构单元。

[0115] (项目3)

[0116] 根据项目2中记载的聚合物(36),其中,官能团X为由选自胺、醇、酚、硫醇、羧酸、胍、烷氧基胺、羟基胺、咪唑、吡啶、酰叠氮、酰卤、卤代烷、酸酐、醛、酮、烷基磺酸盐、马来酰亚胺、环氧化物、氮丙啶、异氰酸酯、异硫氰酸酯、酰亚胺酯、磺酰卤及活化酯中的至少一种衍生的基团,

[0117] 官能团Y为由选自季铵、季磷、叔铈及芳香族阳离子中的至少一种衍生的阳离子基团、或由选自羧酸、磷酸及磺酸中的至少一种衍生的阴离子基团。

[0118] (项目4)

[0119] 根据项目1至3中任一项记载的聚合物(36),其中,蛋白质(38)为氧化还原酶。

[0120] (项目5)

[0121] 根据项目4中记载的聚合物(36),其中,聚合物(36)具备与具有电子传递能力的氧化还原介体(40)共价结合的第3结合部位(50)。

[0122] (项目6)

[0123] 根据项目5中记载的聚合物(36),其中,第1结合部位(46)及第3结合部位(50)具有相同的官能团。

[0124] (项目7)

[0125] 一种试剂层(32),是测定试样中的待分析物的传感器(1)的试剂层(32),其具备:

[0126] 项目1至6中任一项记载的聚合物(36)、和

[0127] 结合于聚合物(36)并且作用于待分析物的蛋白质(38)。

[0128] (项目8)

[0129] 根据项目7中记载的试剂层(32),其具备将蛋白质(38)与第1结合部位(46)结合的第1交联剂(42)。

- [0130] (项目9)
- [0131] 根据项目7或8中记载的试剂层(32),其中,
- [0132] 蛋白质(38)为氧化还原酶,
- [0133] 聚合物(36)具备与具有电子传递能力的氧化还原介体(40)共价结合的第3结合部位(50),
- [0134] 试剂层(32)具备结合于聚合物(36)的氧化还原介体(40)。
- [0135] (项目10)
- [0136] 根据项目9中记载的试剂层(32),其具备将氧化还原介体(40)与第3结合部位(50)结合的第2交联剂(44)。
- [0137] (项目11)
- [0138] 根据项目10中记载的试剂层(32),其具备将氧化还原酶(38)与第1结合部位(46)结合的第1交联剂(42),
- [0139] 第1交联剂(42)及第2交联剂(44)为相同的交联剂。
- [0140] (项目12)
- [0141] 根据项目7至11中任一项记载的试剂层(32),其中,
- [0142] 试剂层(32)具备多个聚合物(36),
- [0143] 各聚合物(36)具有与其他的聚合物(36)共价结合的第4结合部位(52),
- [0144] 试剂层(32)具备将第4结合部位(52)间结合的第3交联剂(54)。
- [0145] (项目13)
- [0146] 根据项目12中记载的试剂层(32),其中,
- [0147] 蛋白质(38)为氧化还原酶,
- [0148] 聚合物(36)具备与具有电子传递能力的氧化还原介体(40)共价结合的第3结合部位(50),
- [0149] 第1结合部位(46)、第3结合部位(50)及第4结合部位(52)的至少两个具有相同的官能团。
- [0150] (项目14)
- [0151] 根据项目12或13中记载的试剂层(32),其中,
- [0152] 蛋白质(38)为氧化还原酶,
- [0153] 聚合物(36)具备与具有电子传递能力的氧化还原介体(40)共价结合的第3结合部位(50),
- [0154] 试剂层(32)具备将氧化还原酶(38)与第1结合部位(46)结合的第1交联剂(42)、和将氧化还原介体(40)与第3结合部位(50)结合的第2交联剂(44),
- [0155] 第1交联剂(42)、第2交联剂(44)及第3交联剂(54)的至少两个为相同的交联剂。
- [0156] (项目15)
- [0157] 一种传感器(1),其具备:
- [0158] 包含工作电极(26)及对电极(30)的电极部(34)、和
- [0159] 接触工作电极(26)地配置的项目7至14中任一项记载的试剂层(32)。
- [0160] (项目16)
- [0161] 根据项目15中记载的传感器(1),其具备覆盖试剂层(32)的保护膜(6)。

[0162] 实施例

[0163] 以下,对本发明的实施例进行说明,这些实施例只不过是用于恰当地说明本发明的例示,对本发明没有任何的限定。

[0164] (聚合物A的合成)

[0165] 图10是表示聚合物A的聚合反应的图。首先,准备出甲基丙烯酸2-氨基乙基酯盐酸盐(单体a)、(4-乙烯基苄基)甲胺(单体b)和甲基丙烯酰氯化胆碱(单体c)。然后,向四口烧瓶中投入0.97mmol的单体a、0.97mmol的单体b、11.97mmol的单体c、0.08mmol的2,2'-偶氮二(2-甲基丙脒)二盐酸盐(以下称作V-50)、227mmol的乙醇。

[0166] 接下来,将搅拌子、温度计、减压/Ar气管线设置于四口烧瓶中。在室温下一边搅拌一边使用减压/Ar气管线反复进行10次四口烧瓶内的减压和Ar气的供给,从而对烧瓶内的试样进行脱气。脱气处理后将四口烧瓶密闭,在反应温度60℃进行24小时图10所示的聚合反应。通过利用¹H-NMR计测单体的消失来确认聚合的进行及结束。反应结束后,将反应液放入透析膜(MWC0:3500),进行3天透析。此时,一天更换两次液体。透析结束后,对所得的反应物进行冷冻干燥而得到聚合物A。聚合物A相当于上述式(7)中n:m:l=21.2:8.1:70.7的聚合物。需要说明的是,各单体的摩尔比根据NMR谱图的信号的积分比算出。对于以下的聚合物B、C、E、F也同样。另外,利用凝胶渗透色谱(GPC)测定的结果是,聚合物A的数均分子量Mn为89642,重均分子量Mw为502171。

[0167] (聚合物B的合成)

[0168] 图11是表示聚合物B的聚合反应的图。首先,准备出单体a和(乙烯基苄基)三甲基氯化铵(单体d)。然后,向四口烧瓶中投入7.36mmol的单体a、7.36mmol的单体d、0.07mmol的V-50、616mmol的离子交换水。以后实施与聚合物A的情况同样的处理,进行图11所示的聚合反应而得到聚合物B。聚合物B相当于上述式(4)中n:m=48.5:51.5的聚合物。

[0169] (聚合物C的合成)

[0170] 图12是表示聚合物C的聚合反应的图。首先,准备出单体a和单体c。然后,向四口烧瓶中投入1.14mmol的单体a、10.22mmol的单体c、0.06mmol的V-50、离子交换水。以后进行与聚合物A的情况同样的处理,进行图12所示的聚合反应而得到聚合物C(根据需要恰当地调整反应时间)。聚合物C相当于上述式(6)中n:m=13.3:86.7的聚合物。

[0171] (作为比较例的介体结合聚合物D的制作)

[0172] 作为介体准备出吩嗪,具体而言准备出5-[(2,5-二氧代吡啶-1-基)氧基]-5-氧代戊基)-1-甲氧基吩嗪鎓硝酸盐(东京化成工业株式会社制)。称取0.47mg的该介体,溶解于47μL的MiliQ水中。另外,作为比较例的聚合物D准备出聚(L-赖氨酸)盐酸盐(PLKC800:Alamanda Polymers公司制)。该聚合物D相当于不具有对于后述的试剂制备中使用的葡萄糖脱氢酶的第2结合部位48的聚合物。称取0.513mg的聚合物D,溶解于51.3μL的MiliQ水中。另外,称取9.59mg的缩合剂(WSC W001:同仁化学公司制),溶解于479.3μL的MiliQ中。

[0173] 将这3个溶液与250mM的2-吗啉乙磺酸(MES)缓冲液(pH6.0)96μL混合,并且用MiliQ水将合计体积调整为1200μL。其后,用约20小时在室温下一边搅拌混合液一边使反应进行。反应结束后,使用离心式超滤过滤器(Amicon Ultra-4 50k:Merck-Millipore公司制)进行数次反应液的超滤,将除去了低分子的液体作为介体结合聚合物D(聚(L-赖氨酸)结合吩嗪)的溶液回收。

[0174] (介体结合聚合物A的制作)

[0175] 除了替代聚合物D而称取2.63mg的聚合物A、并溶解于175.4 μ L的MiliQ水中这一点以外,利用与介体结合聚合物D的制作同样的方法制作出介体结合聚合物A的溶液。

[0176] (介体结合聚合物B的制作)

[0177] 除了替代聚合物D而称取1.56mg的聚合物B、并溶解于104.1 μ L的MiliQ水中这一点以外,利用与介体结合聚合物D的制作同样的方法制作出介体结合聚合物B的溶液。

[0178] (介体结合聚合物C的制作)

[0179] 除了替代聚合物D而称取6.08mg的聚合物C、并溶解于405.2 μ L的MiliQ水中这一点以外,利用与介体结合聚合物D的制作同样的方法制作出介体结合聚合物C的溶液。

[0180] 将各介体结合聚合物的溶液稀释25倍,各自向微孔板中投入100 μ L。然后,使用读板仪(Plate Reader)测定出各溶液的吸收光谱。将结果表示于图13中。需要说明的是,微孔板使用了UV-Star(注册商标)96Well F-Boden(Greiner Bio-One公司制)。另外,读板仪使用了infinite(注册商标)M200 Pro(TECAN公司制)。

[0181] 图13是表示各介体结合聚合物的吸收光谱的图。如图13所示,在任意的介体结合聚合物中都在波长230nm~330nm之间和330nm~430nm之间分别观察到峰。这两个峰是来自吩嗪的峰。由该结果确认,在各聚合物结合有吩嗪。

[0182] (试剂液的制备)

[0183] 将以下所示的各试剂混合,使之达到以下的最终浓度,反应约1小时而制备出试剂液。需要说明的是,碳分散液在使用前在超声波浴中处理约10分钟后使用。

[0184] • 磷酸钠缓冲液(pH6.5)最终浓度8mM

[0185] • FAD依赖性葡萄糖脱氢酶(GDH GLD1:BBI International公司制)最终浓度2000U/mL

[0186] • 戊二醛25%溶液(和光纯药工业公司制)最终浓度0.005%(wt/v)

[0187] • 各介体结合聚合物最终浓度1(386nm的吸光度相当于1)

[0188] • 碳分散液最终浓度4mg/mL

[0189] 需要说明的是,磷酸钠缓冲液利用磷酸氢二钠(和光纯药工业公司制)和磷酸二氢钠(和光纯药工业公司制)制备。将科琴黑(EC300J:LION SPECIALTY CHEMICALS株式会社制)混合到5mg/mL的羟丙基纤维素(NISSO HPCL日本曹达株式会社制)溶液中,使得碳浓度为16mg/mL,利用超声波均化器处理3分钟以上,由此得到碳分散液。关于各介体结合聚合物的浓度,将各聚合物的溶液稀释25倍后向微孔板中投入100 μ L,利用读板仪测定吸收光谱,由此确认溶液中的各聚合物的浓度,基于其值进行调整。

[0190] (保护膜用聚合物溶液的制备)

[0191] 将以下所示的各试剂混合,使之达到以下的最终浓度,制备出保护膜用聚合物溶液。

[0192] • 聚(甲基丙烯酸叔丁酯-b-4-乙基吡啶)(Polymer Source公司制、以下称作tBuMA4VP)最终浓度7.11%

[0193] • 聚丙二醇甲醚-苯乙烯-4-乙基吡啶的无规共聚物(Polymer Source公司制、以下称作PGMAS4VP)最终浓度0.89%

[0194] • 聚(乙二醇)二甲醚(Sigma Aldrich公司制、以下称作PEGDGE)最终浓度0.98%

[0195] • HEPES缓冲液 (pH8.0) 最终浓度5mM

[0196] 需要说明的是,将tBuMA4VP、PGMAS4VP及PEGDGE溶解于乙醇中使用。关于tBuMA4VP的数均分子量 M_n ,聚(甲基丙烯酸叔丁酯)为80000,聚(4-乙烯基吡啶)为77000。tBuMA4VP的 M_w/M_n 为1.15。PGMAS4VP为聚丙二醇甲基醚:苯乙烯:4-乙烯基吡啶=24:16:60,数均分子量 M_n 为52000,重均分子量 M_w 为94000, M_w/M_n 为1.8。PEGDGE的数均分子量 M_n 为~1000。HEPES缓冲液使用2-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸(同仁化学公司制)制备。

[0197] (传感器用电极的制作)

[0198] 利用溅射在绝缘基板上形成金电极。将含有各介体结合聚合物的试剂液在不同的金电极涂布0.4 μ L,干燥约15分钟。在各金电极再次涂布试剂液0.4 μ L后,彻夜干燥。由此,在各金电极上形成试剂层。将形成有试剂层的各金电极浸渍于保护膜用聚合物溶液中,提起并干燥,将该操作反复进行多次。在该操作完成后干燥一天,在各金电极上形成保护膜。利用以上的工序,得到具备含有各介体结合聚合物的试剂层和覆盖试剂层的保护膜的传感器用电极。

[0199] (传感器的耐久性评价)

[0200] 以所制作的传感器用电极为工作电极,组合作为对电极的金电极和作为参比电极的Ag/AgCl电极(饱和KCl)(BAS公司制)而制作出3电极式的电极部。然后,使用恒电位仪(BAS公司制),利用安培测定法测定磷酸缓冲生理盐水中的电流的时间变化。

[0201] 具体而言,从测定开始1000秒后每500秒添加葡萄糖,使之达到理论值50mg/dL、150mg/dL、300mg/dL、500mg/dL,连续地测定电流响应值。测定后将电极保存在37°C的磷酸缓冲生理盐水中。保存一天后,进行同样的测定。需要说明的是,葡萄糖浓度50mg/dL、150mg/dL、300mg/dL时的电流值设为根据从添加成为测定对象的葡萄糖后即下一次添加葡萄糖前的5秒前、10秒前、15秒前、20秒前及25秒前的5点的测定值算出的平均值。

[0202] 另外,最终浓度的电流值设为以使葡萄糖浓度为500mg/dL的方式添加葡萄糖溶液后、根据480秒后、485秒后、490秒后、495秒后及500秒后的5点的测定值算出的平均值。需要说明的是,各葡萄糖浓度时的电流值是实施减去葡萄糖浓度0mg/dL时的电流值的背景修正处理后的电流值。将结果表示于图14中。

[0203] 图14是表示传感器的耐久性评价的结果的图。如图14所示,与介体结合聚合物D(比较例)相比,介体结合聚合物A~C中,对于第一天和保存一天后而言电流值的变化小。特别是在300~500mg/dL的高浓度区域中,电流值的减少得到显著的抑制。由该结果确认,根据介体结合聚合物A~C,可以抑制氧化还原酶(蛋白质)及氧化还原介体的流出,从而可以提高传感器的耐久性等。

[0204] 需要说明的是,发明人等对聚合物E及聚合物F也实际地进行了合成。以下对各聚合物的合成步骤进行说明。

[0205] (聚合物E的合成)

[0206] 图15是表示聚合物E的聚合反应的图。首先,准备出单体b和单体c。然后,向四口烧瓶中投入0.85mmol的单体b、7.61mmol的单体c、0.25mmol的2,2'-偶氮二(4-甲氧基-2,4-二甲基戊腈)(以下称作V-70)。以后进行与聚合物A的情况同样的处理,进行图15所示的聚合反应而得到聚合物E(根据需要恰当地调整反应温度、反应时间)。聚合物E相当于上述式(5)中n:m=15.0:85.0的聚合物。

[0207] (聚合物F的合成)

[0208] 图16是表示聚合物F的聚合反应的图。首先,准备出烯丙基胺盐酸盐(单体e)和单体c。然后,向四口烧瓶中投入92.22mmol的单体e、9.22mmol的单体c、66.1mmol的V-50、590mmol的离子交换水。以后进行与聚合物A的情况同样的处理,进行图16所示的聚合反应而得到聚合物F。聚合物F相当于上述式(3)中n:m=5.8:94.2的聚合物。

[0209] 产业上的可利用性

[0210] 本申请可以用于聚合物、试剂层及传感器中。

[0211] 附图标记说明

[0212] 1传感器,6保护膜,26工作电极,30对电极,32试剂层,34电极部,36聚合物,38蛋白质,40氧化还原介体,42第1交联剂,44第2交联剂,46第1结合部位,48第2结合部位,50第3结合部位,52第4结合部位,54第3交联剂。

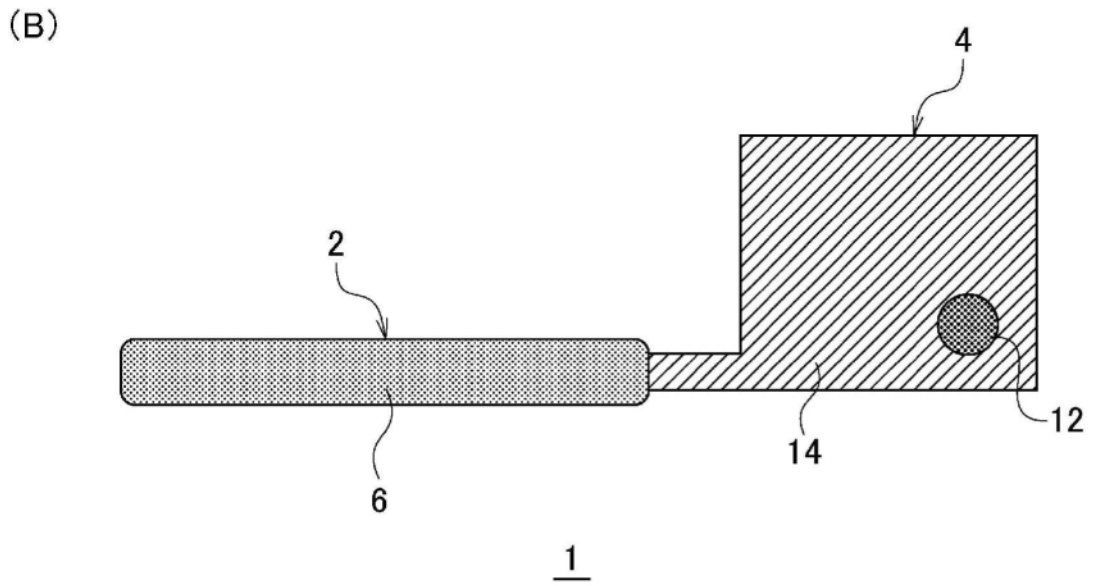
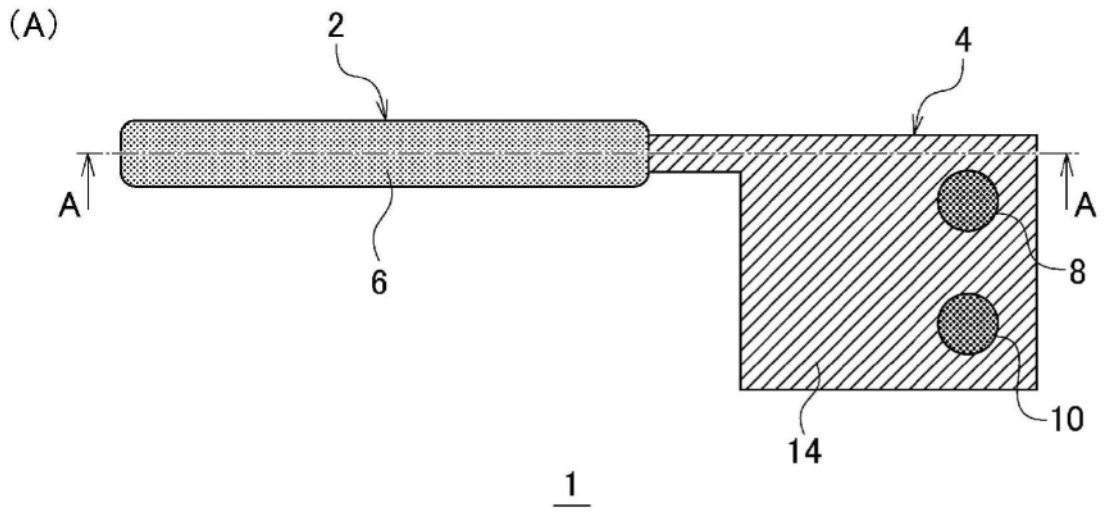


图1

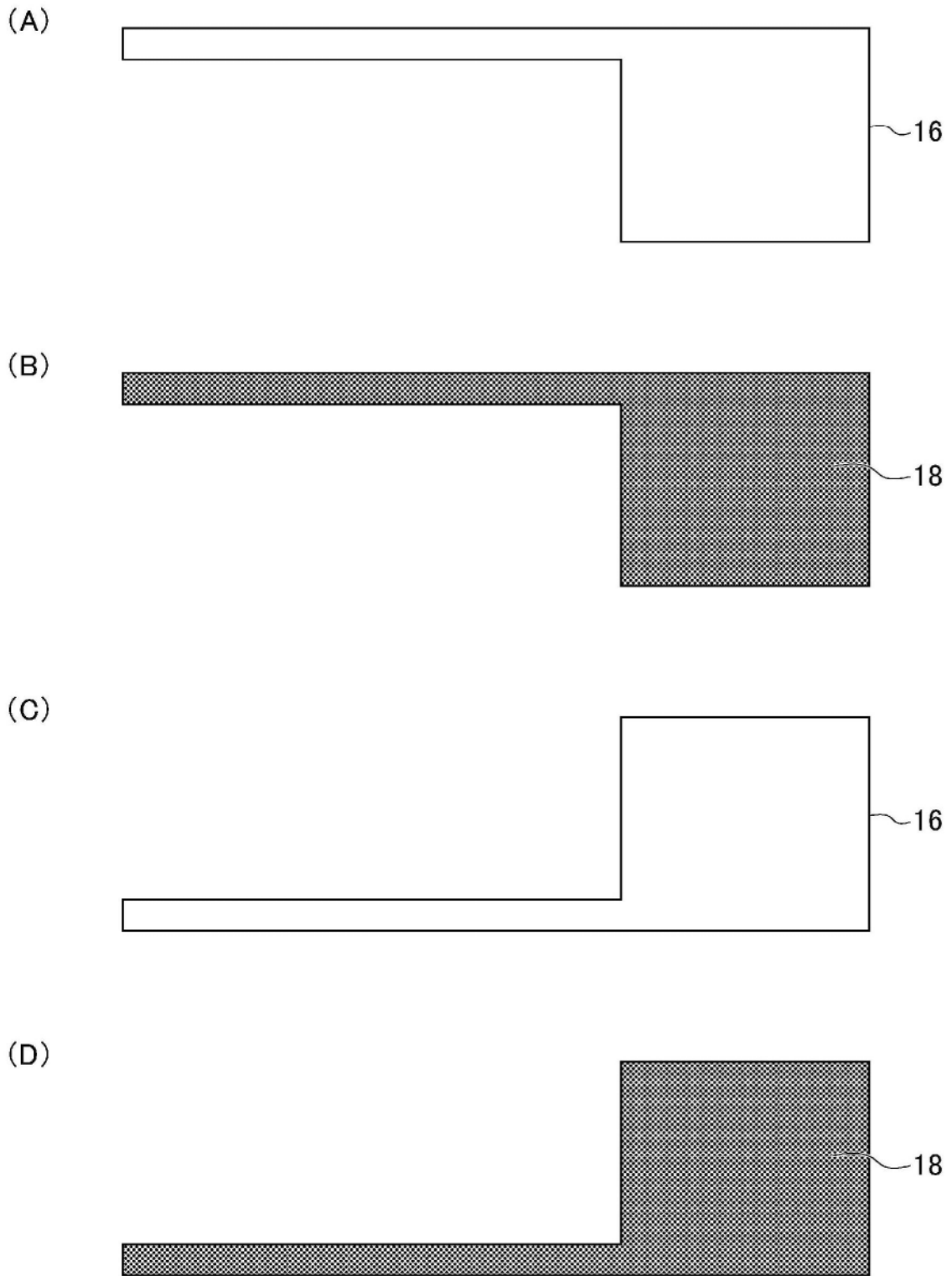


图2

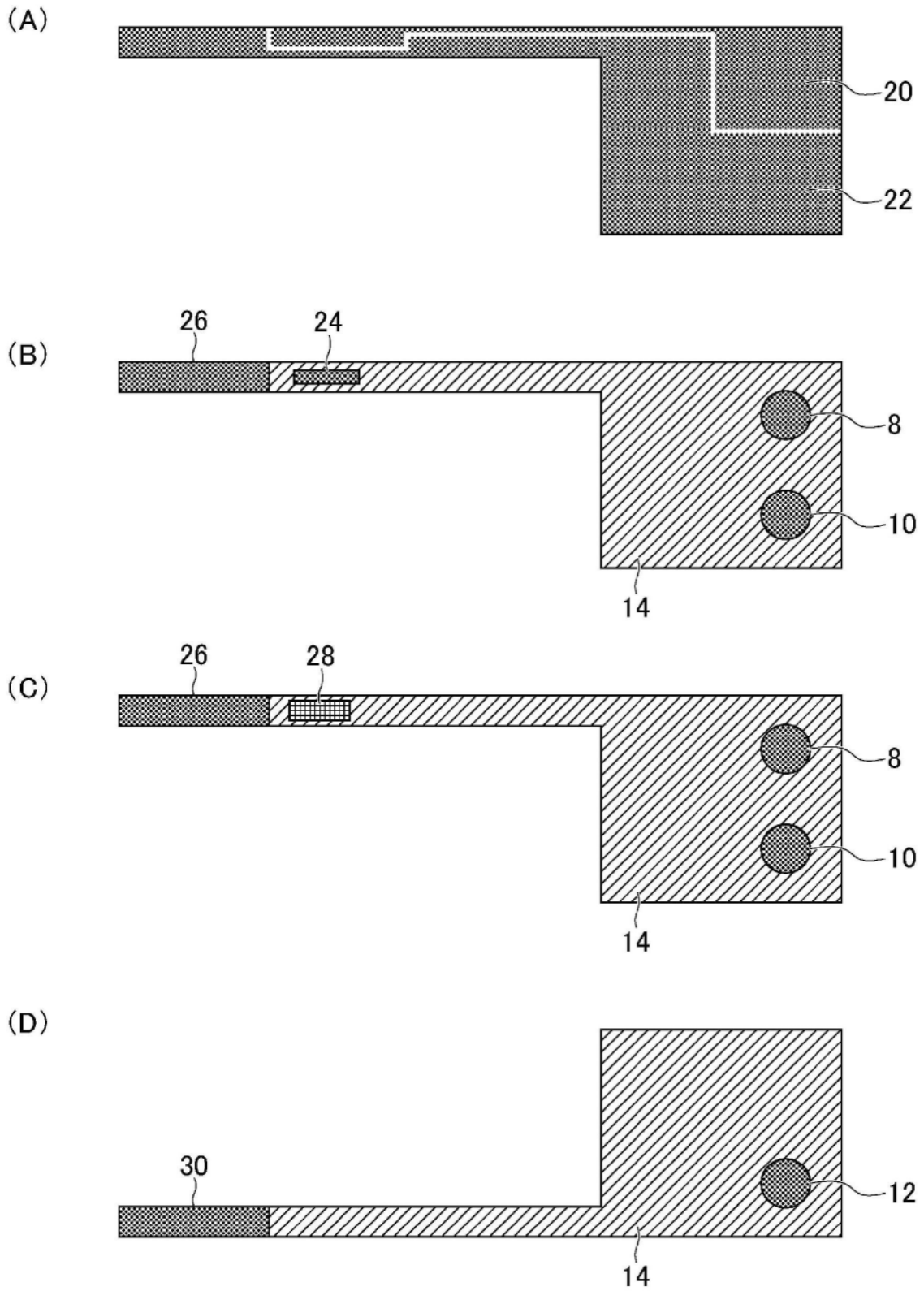


图3

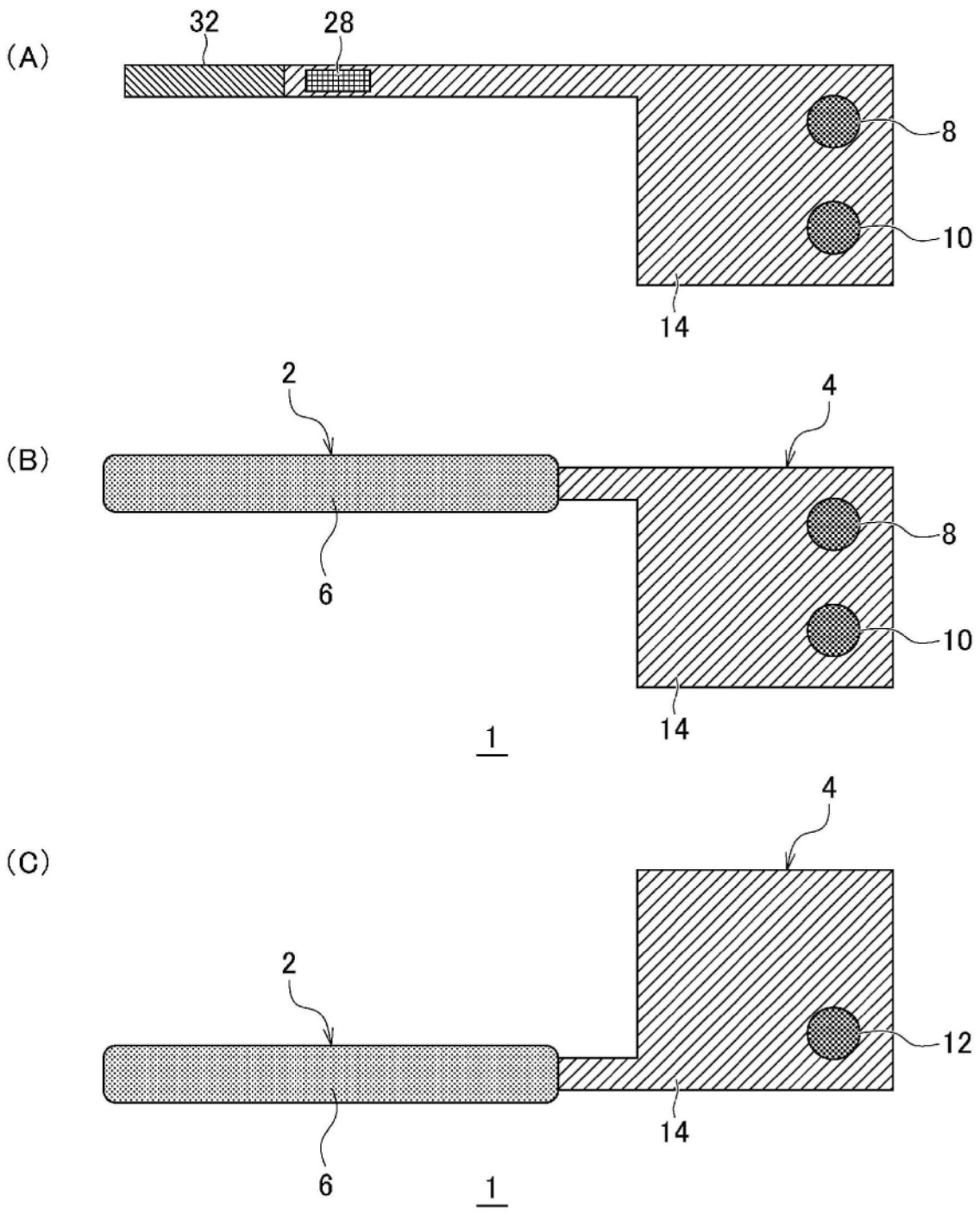


图4

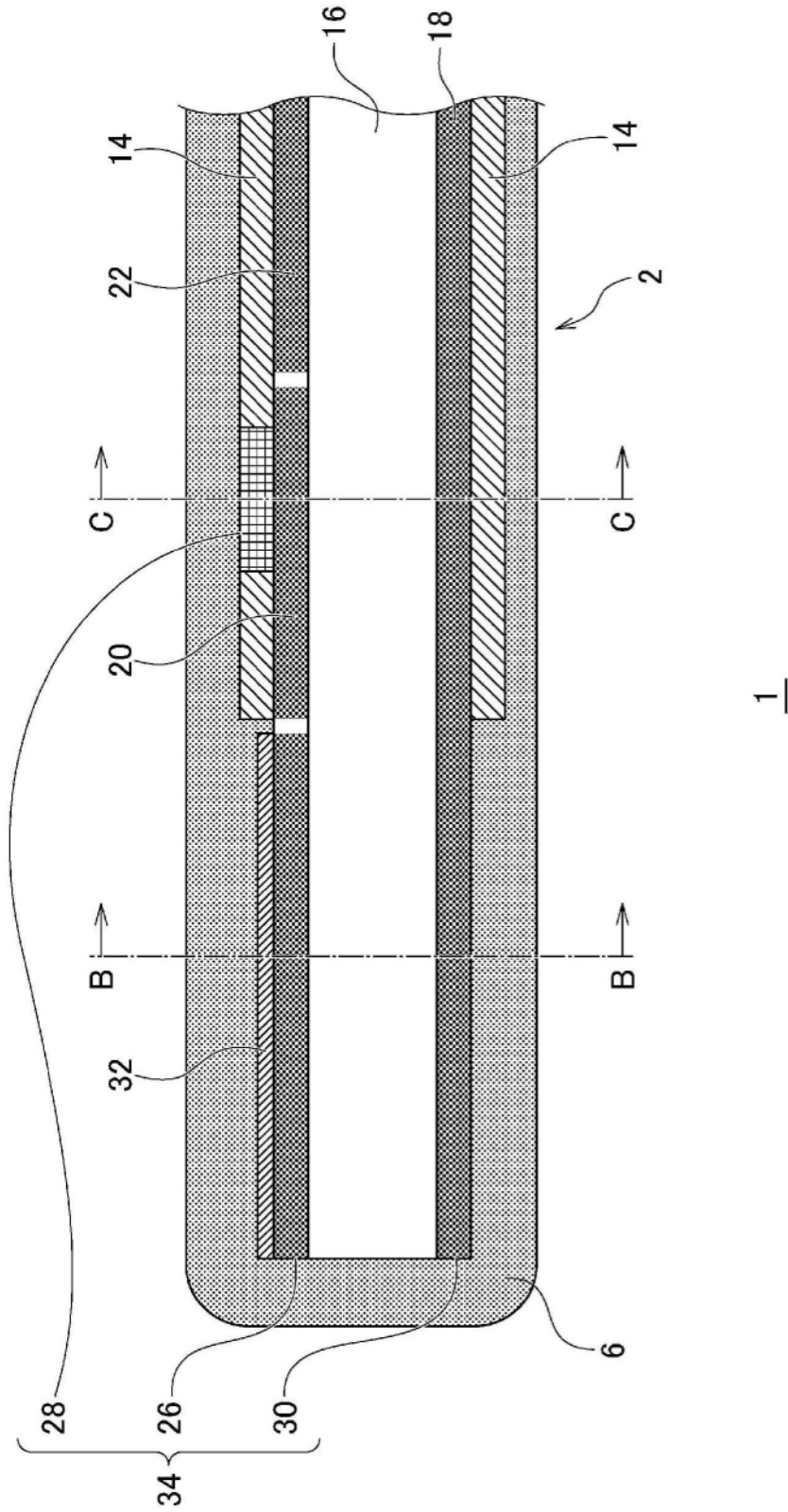
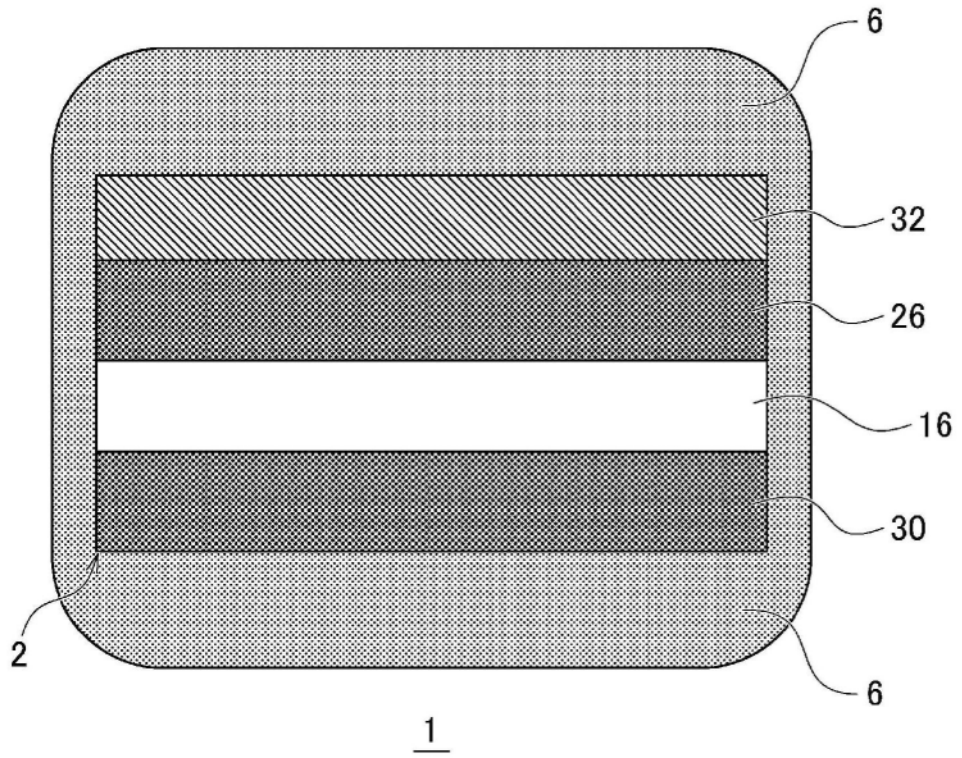


图5

(A)



(B)

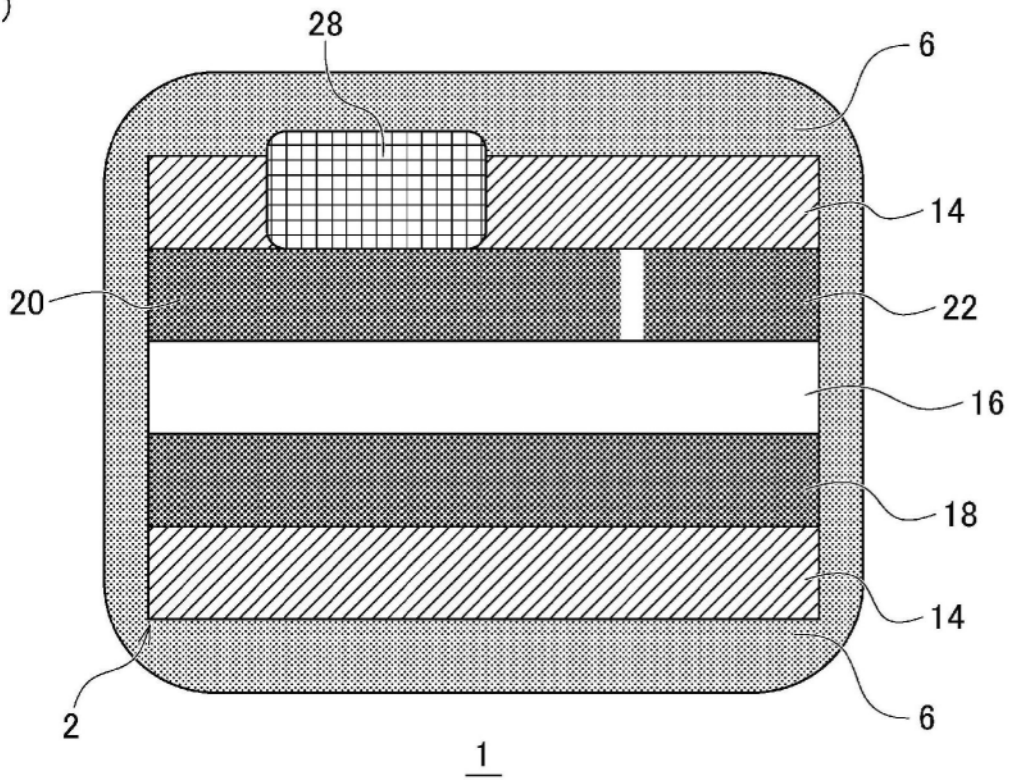


图6

第1反应基团与第2反应基团的结合结构	第1反应基团 (由下述化合物衍生的基团)	第2反应基团 (由下述化合物衍生的基团)
酰胺	胺	羧酸
	胺	活化酯
	胺	酰叠氮
	胺	酰卤
	胺	酸酐
醚	醇或酚	卤代烷
	醇或酚	烷基磺酸盐
硫醚	硫醇	马来酰亚胺
	硫醇	环氧化物
	硫醇	卤代烷
	硫醇	烷基磺酸盐
	硫醇	氮丙啶
酯	醇或酚	羧酸
	羧酸	卤代烷
	醇或酚	酰卤
	醇或酚	酸酐
硫酯	硫醇	羧酸
脞	肼	醛或酮
脲	胺	异氰酸酯
硫脲	胺	异硫氰酸酯
脒	烷氧基胺	醛或酮
	羟基胺	醛或酮
脘	胺	酰亚胺酯
烷基胺	胺	环氧化物
	胺	卤代烷
氨基甲酸酯	醇或酚	异氰酸酯
咪唑鎓	咪唑	环氧化物
	咪唑	卤代烷
	咪唑	烷基磺酸盐
吡啶鎓	吡啶	环氧化物
	吡啶	卤代烷
	吡啶	烷基磺酸盐
磺酰胺	胺	磺酰卤
磺酸酯	醇或酚	磺酰卤
亚胺	胺	醛或酮

图8

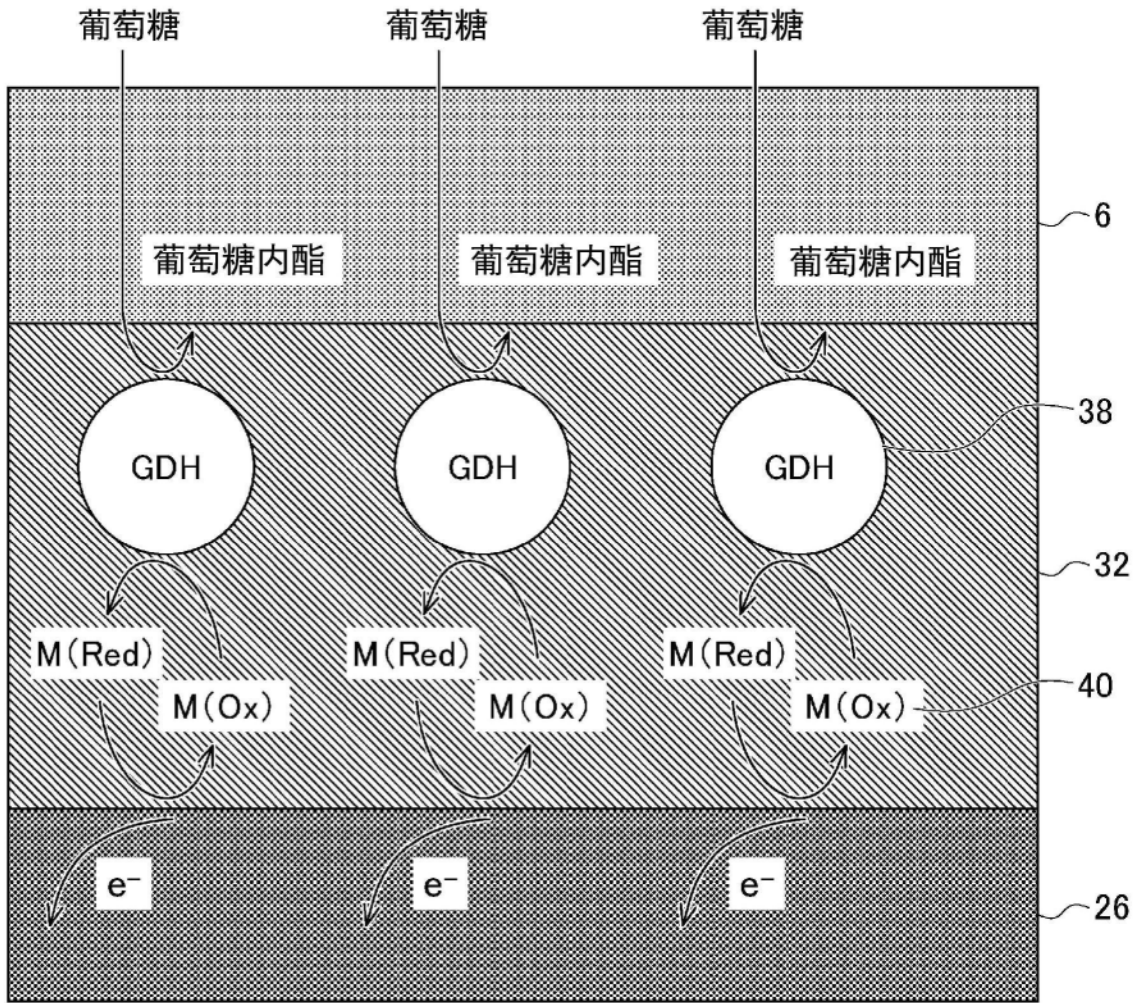


图9

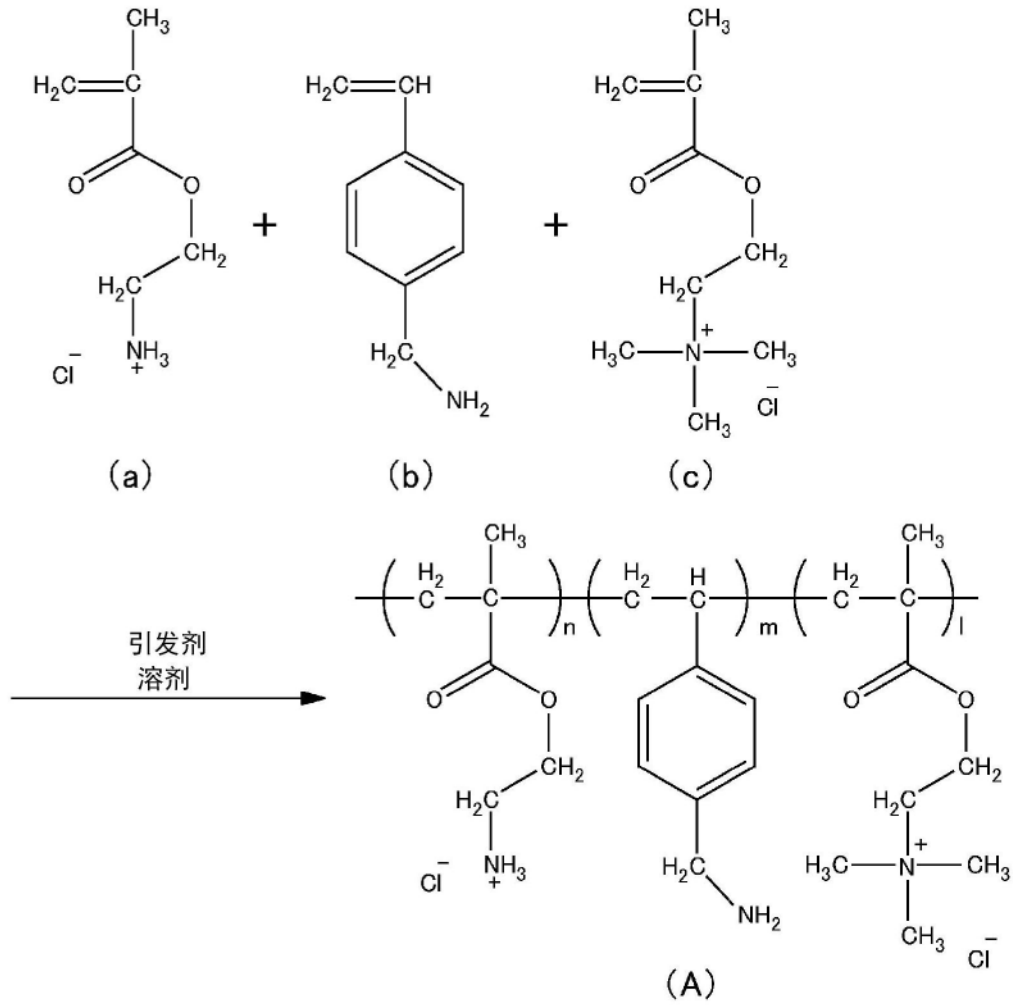


图10

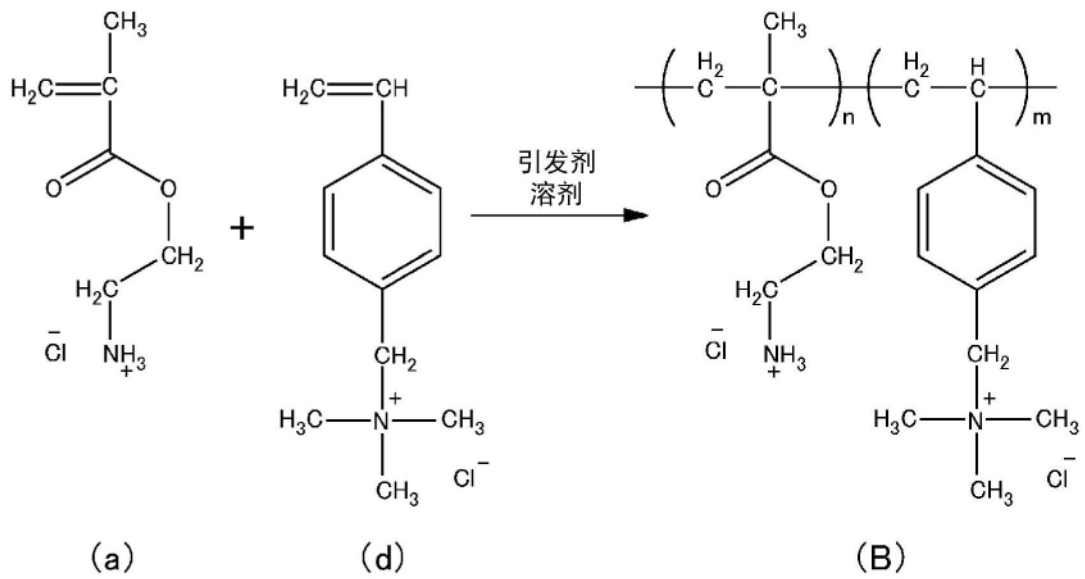


图11

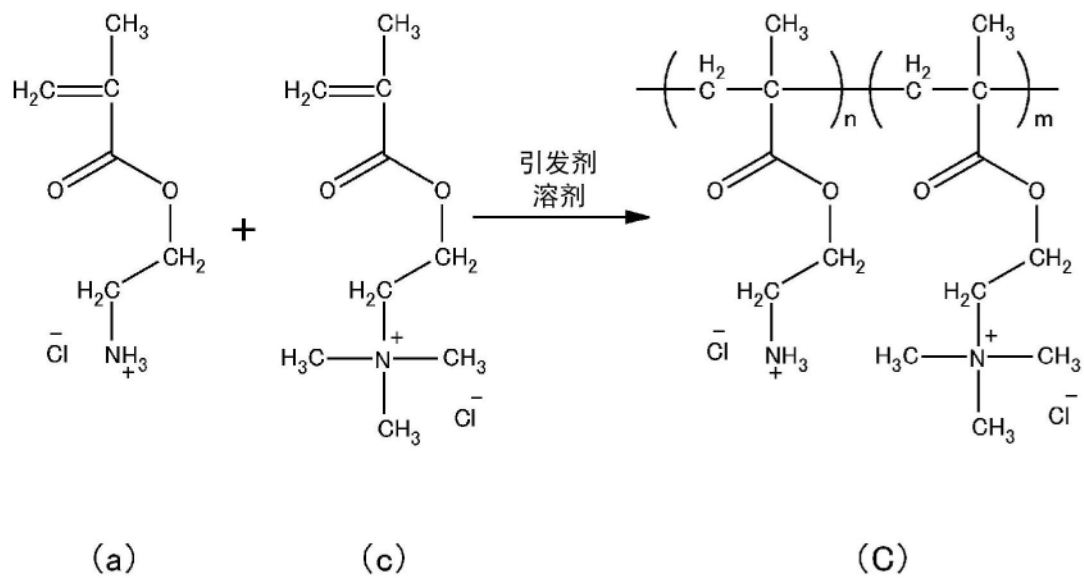


图12

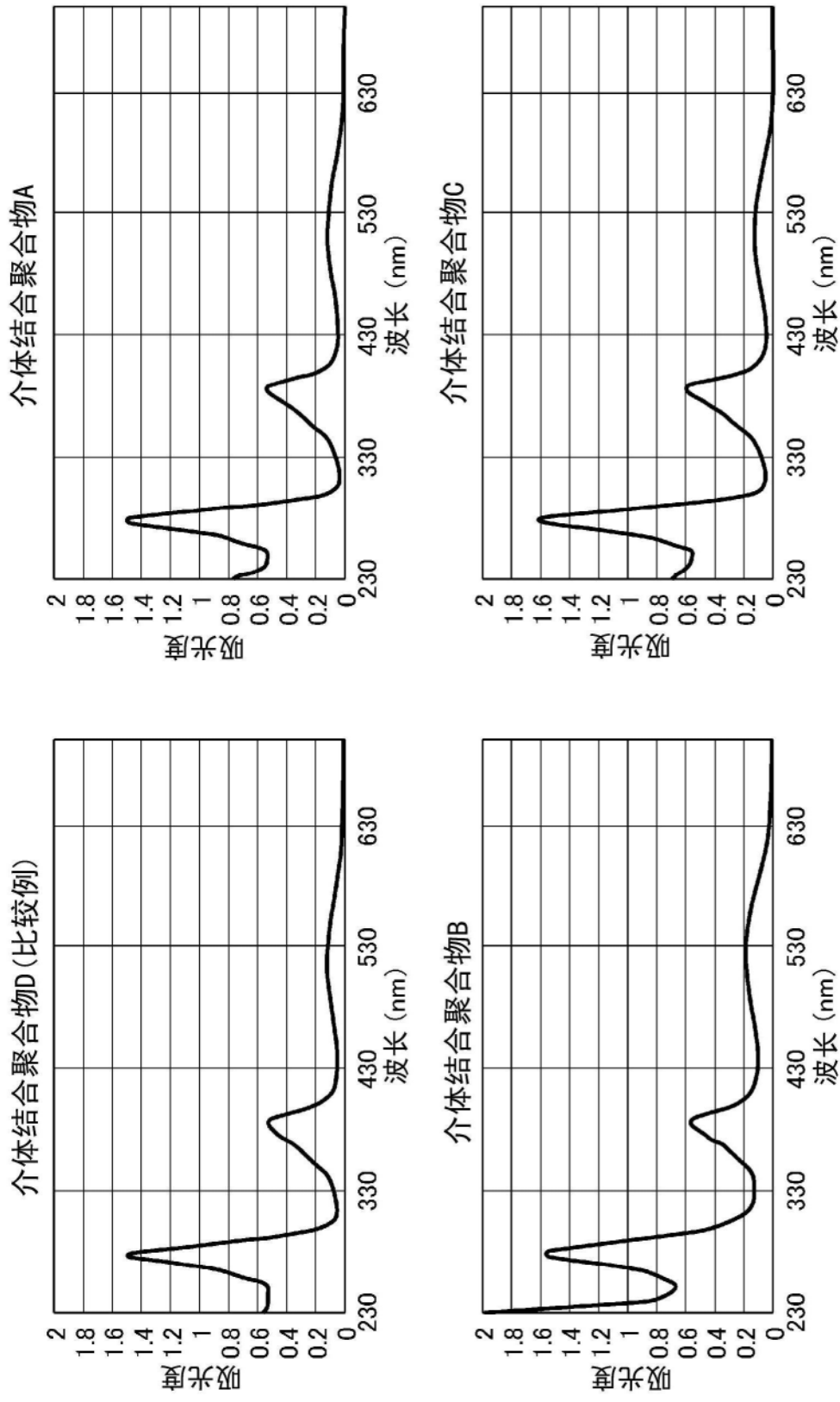


图13

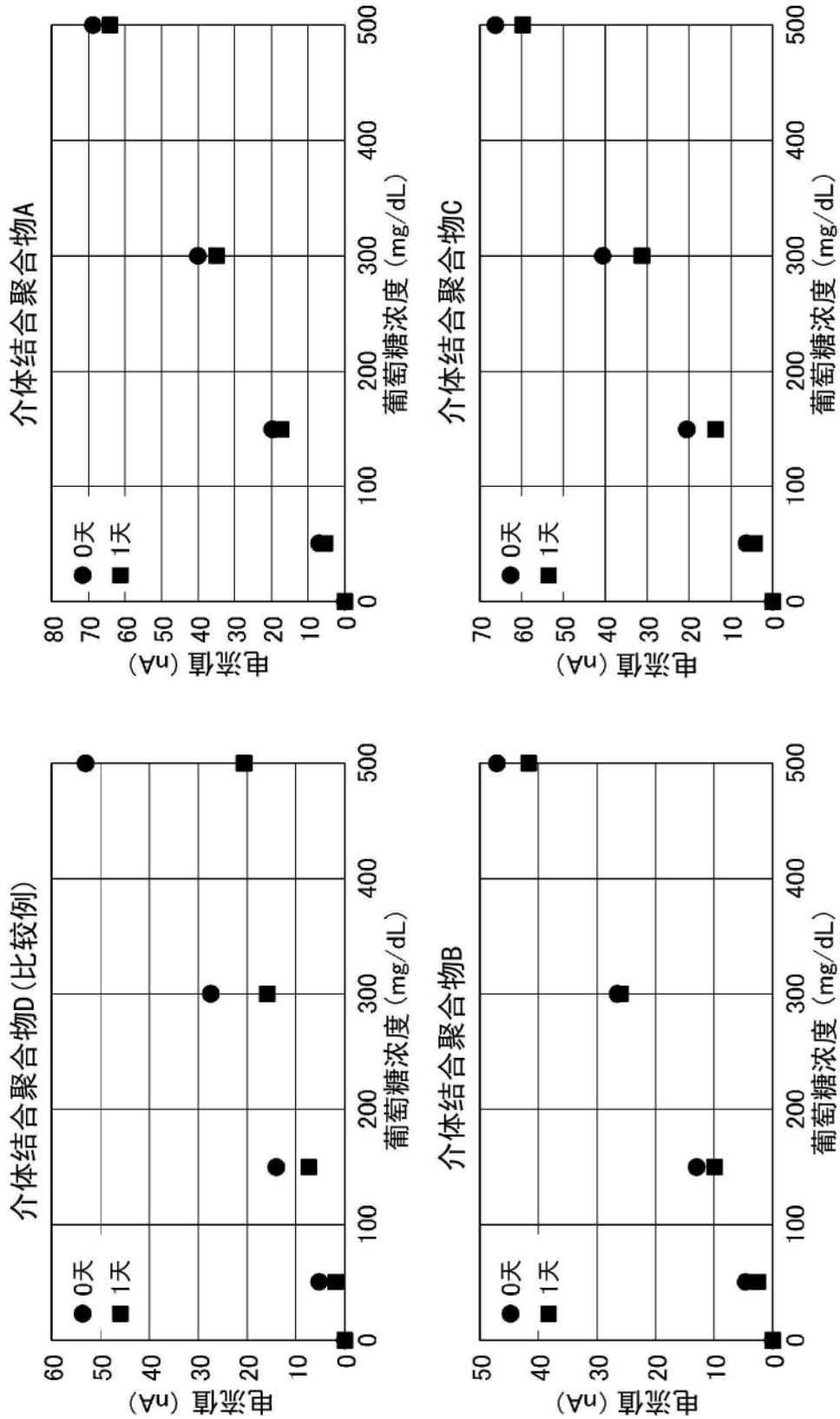


图14

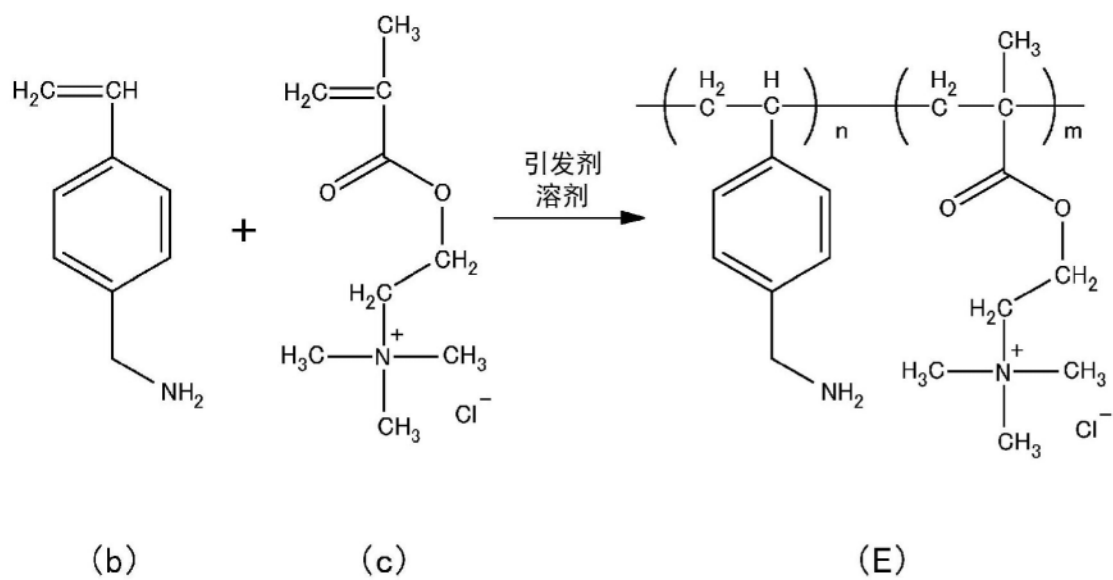


图15

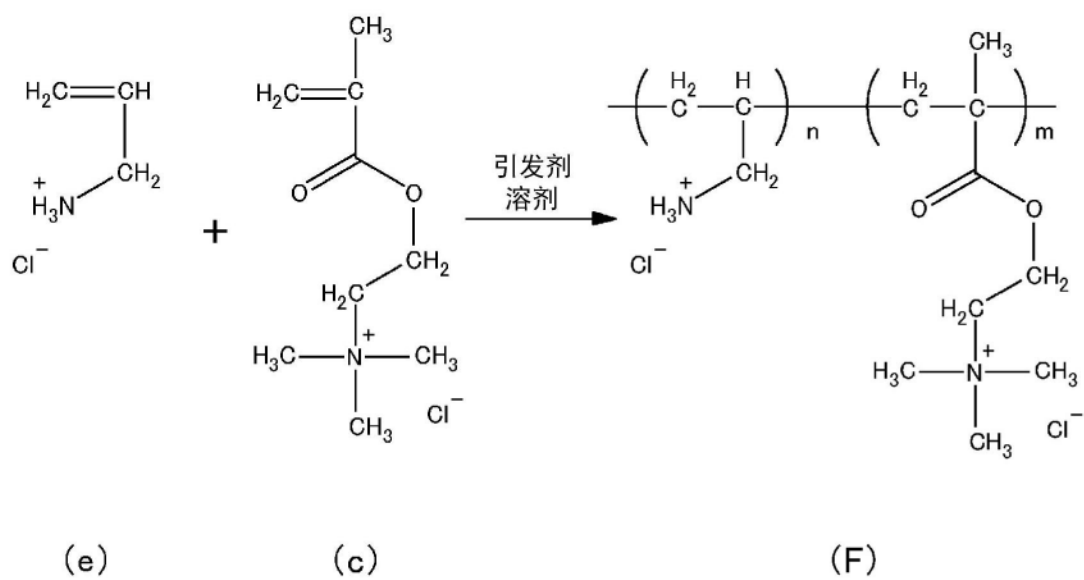


图16