

## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101203748 B

(45) 授权公告日 2011.09.14

(21) 申请号 200680022621.3

(22) 申请日 2006.05.18

## (30) 优先权数据

148253/2005 2005.05.20 JP

## (85) PCT申请进入国家阶段日

2007.11.19

## (86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2006/309906 2006.05.18

## (87) PCT申请的公布数据

W02006/123730 JA 2006.11.23

(73) 专利权人 爱科来株式会社

地址 日本国京都府

(72) 发明人 胜木幸治 山冈秀亮

## (56) 对比文件

JP 8-10208 B2, 1996.01.31, 全文.

WO 2005/023111 A1, 2005.03.17, 全文.

CN 1321245 A, 2001.11.07, 全文.

US 6773563 B2, 2004.08.10, 全文.

WO 03/106702 A1, 2003.12.24, 全文.

Z. Salamon and G. Tollin. Interfacial electrochemistry of cytochrome c at a lipid bilayer modified electrode: effect of incorporation of negative charges into the bilayer on cyclic voltammetric parameters. 《Bioelectrochemistry and Bioenergetics》. 1991, 第26卷(第2期), 321-334.

审查员 黄斌

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳

## (51) Int. Cl.

G01N 27/327(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

C12N 11/08(2006.01)

G01N 27/416(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 10 页

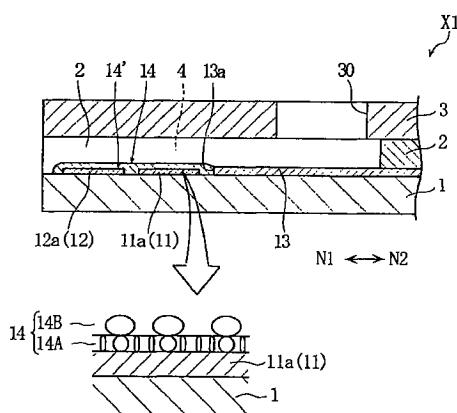
## (54) 发明名称

蛋白质固定膜、蛋白质的固定化方法、酶固定化电极和生物传感器

## (57) 摘要

本发明涉及含有细胞膜类似结构层(14A)和固定在细胞膜类似结构层(14A)上且含有细胞色素或细胞色素复合体的蛋白质(14B)的蛋白质固定化膜(14)。本发明还涉及用于形成蛋白质固定化膜(14)的方法、具有蛋白质固定化膜(14)的酶固定化电极和生物传感器(X1)。优选为，细胞膜类似结构层(14A)例如含有磷脂质聚合物，蛋白质(14B)例如为含有具有葡萄糖脱氢活性的α亚单位和具有电子传递功能的细胞色素C的CyGDH。

CN 101203748 B



1. 一种酶固定化膜,其特征在于,包括 :

细胞膜类似结构层;和

固定在所述细胞膜类似结构层上,且含有细胞色素或细胞色素复合体的酶,  
所述细胞膜类似结构层含有磷脂质聚合物。

2. 如权利要求 1 所述的酶固定化膜,其特征在于 :

所述磷脂质聚合物为 2- 甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱聚合物。

3. 如权利要求 1 所述的酶固定化膜,其特征在于 :

所述磷脂质聚合物导入有硅烷偶联剂。

4. 如权利要求 3 所述的酶固定化膜,其特征在于 :

所述硅烷偶联剂为四乙氧基硅烷。

5. 如权利要求 1 所述的酶固定化膜,其特征在于 :

所述酶为含有具有葡萄糖脱氢活性的  $\alpha$  亚单位和具有电子传递功能的细胞色素 C 的 CyGDH。

6. 一种酶的固定化方法,其特征在于,包括 :

在被固定化部件的目的部位形成细胞膜类似结构层的第一步骤;和

相对于所述细胞膜类似结构层,使含有细胞色素或细胞色素复合体的酶自行组织化的第二步骤,

所述细胞膜类似结构层含有磷脂质聚合物。

7. 如权利要求 6 所述的酶的固定化方法,其特征在于 :

所述磷脂质聚合物为 2- 甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱聚合物。

8. 如权利要求 6 所述的酶的固定化方法,其特征在于 :

还包括在所述第一步骤之前进行且对所述目的部位进行亲水处理的第三步骤。

9. 如权利要求 8 所述的酶的固定化方法,其特征在于 :

在所述第二步骤中,所述磷脂质聚合物形成为导入有硅烷偶联剂的层。

10. 如权利要求 9 所述的酶的固定化方法,其特征在于 :

所述硅烷偶联剂为四乙氧基硅烷。

11. 如权利要求 6 所述的酶的固定化方法,其特征在于 :

所述酶为含有具有葡萄糖脱氢活性的  $\alpha$  亚单位和具有电子传递功能的细胞色素 C 的 CyGDH。

12. 一种酶固定化电极,其特征在于 :

包括基材和固定在所述基材上的含酶层,并且,

所述含酶层包括 :细胞膜类似结构层;和将在相对于所述细胞膜类似结构层自行组织化状态下被固定的细胞色素作为亚单位的酶,

所述细胞膜类似结构层含有磷脂质聚合物。

13. 如权利要求 12 所述的酶固定化电极,其特征在于 :

所述磷脂质聚合物为 2- 甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱聚合物。

14. 如权利要求 12 所述的酶固定化电极,其特征在于 :

所述磷脂质聚合物导入有硅烷偶联剂。

15. 如权利要求 14 所述的酶固定化电极,其特征在于 :

所述硅烷偶联剂为四乙氧基硅烷。

16. 如权利要求 12 所述的酶固定化电极, 其特征在于 :

所述酶为含有具有葡萄糖脱氢活性的  $\alpha$  亚单位和具有电子传递功能的细胞色素 C 的 CyGDH。

17. 一种生物传感器, 其特征在于 :

包括基板和固定在所述基板上的含酶层, 并且,

所述含酶层包括 : 细胞膜类似结构层 ; 和将在相对于所述细胞膜类似结构层自行组织化状态下被固定的细胞色素作为亚单位的酶,

所述细胞膜类似结构层含有磷脂质聚合物。

18. 如权利要求 17 所述的生物传感器, 其特征在于 :

所述磷脂质聚合物为 2- 甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱聚合物。

19. 如权利要求 17 所述的生物传感器, 其特征在于 :

所述磷脂质聚合物导入有硅烷偶联剂。

20. 如权利要求 19 所述的生物传感器, 其特征在于 :

所述硅烷偶联剂为四乙氧基硅烷。

21. 如权利要求 17 所述的生物传感器, 其特征在于 :

所述酶为含有具有葡萄糖脱氢活性的  $\alpha$  亚单位和具有电子传递功能的细胞色素 C 的 CyGDH。

22. 如权利要求 17 所述的生物传感器, 其特征在于, 还包括 :

用于使试样移动的流路 ; 和

设置在流路内部的试剂部。

23. 如权利要求 22 所述的生物传感器, 其特征在于,

还包括在所述流路中露出一部分, 且用于向试样施加电压的工作电极和对电极。

24. 如权利要求 23 所述的生物传感器, 其特征在于 :

所述细胞膜类似结构层的至少一部分形成在所述工作电极上。

25. 如权利要求 22 所述的生物传感器, 其特征在于 :

所述试剂部含有显色剂。

26. 如权利要求 25 所述的生物传感器, 其特征在于 :

所述试剂部包括 : 含有所述显色剂的显色层 ; 和包括所述细胞膜类似结构层和所述酶的含酶层。

# 蛋白质固定膜、蛋白质的固定化方法、酶固定化电极和生物传感器

## 技术领域

[0001] 本发明涉及将含有细胞色素的蛋白质固定在被固定化材料上的技术。

## 背景技术

[0002] 作为生物传感器，广泛使用能够由电化学方法或光学方法进行试样分析的生物传感器。作为用于由电化学方法进行试样分析的生物传感器，例如有本申请的图 12 所示的生物传感器 9（例如，参照专利文献 1）。

[0003] 图示的生物传感器 9 在形成有工作电极 90 和对电极 91 的基板 92 上，隔着隔板 93 接合有盖 94。该生物传感器 9 还具有由基板 92、隔板 93 和盖 94 规定的流路 95。该流路 95 利用毛细管力使试样移动，在其内部形成试剂部 96。

[0004] 试剂部 96 由工作电极 90 和对电极 91 的端部彼此连接形成，并含有氧化还原酶。氧化还原酶例如是催化从葡萄糖获取电子的反应的酶，从葡萄糖获取的电子被供给到工作电极 90。对工作电极 90 的电子供给量能够利用工作电极 90 和对电极 91，作为应答电流进行测定。

[0005] 在此，作为用于形成试剂部 96 的代表性的方法，即用于固定氧化还原酶的代表性的方法，有如下说明的 4 种方法（例如，参照非专利文献 1）。

[0006] 第一种方法是将含有氧化还原酶的材料液滴加到对象物的目的部位后，使材料液干燥，由此将氧化还原酶固定在对象物的目的部位上的方法。

[0007] 第二种方法是使用戊二醛等交联剂将氧化还原酶固定在对象物的目的部位上的方法。

[0008] 第三种方法是在使氧化还原酶包括在羧甲基纤维素（CMC）等聚合物中的状态下，将聚合物与氧化还原酶一同固定的方法。

[0009] 第四种方法是使用在碳糊等导电性成分中分散有氧化还原酶的糊，将该糊涂敷在对象物的目的部位上，将氧化还原酶固定的方法。

[0010] 但是，在现有的氧化还原酶的固定方法中，不能以使活性部位位于氧化还原酶的活性表达高效的方式（位置）的方式将各个氧化还原酶固定。即，存在有不能控制氧化还原酶的取向性而固定化的问题。例如，在现有方法中，由于邻接存在的氧化还原酶的活性部位相向存在，或者由于蛋白质彼此凝集而使活性部位存在于凝集块的内部，所以能够有效利用的氧化还原酶（活性部位）的比例相对低。因此，能够与基质接触的氧化还原酶的概率变低，从而使被固定化的氧化还原酶的整体的活性变低。其结果，为了通过被固定化的氧化还原酶实现目的功能，就必须增加氧化还原酶的使用量，在成本方面不利。特别是氧化还原酶大多数很贵，因此对于氧化还原酶需要增加使用量而引起的成本问题的缺陷就更加显著。

[0011] 另外，由于不能控制氧化还原酶的取向性，所以即使氧化还原酶的使用量相同，每个生物传感器实际能够利用的氧化还原酶的比例也会产生不均衡。其结果，在不能控制取

向性的现有的固定化方法中,因该固定化方法而产生测定结果的不均衡。

[0012] 在上述说明的生物传感器 9 中,另外,在氧化还原酶的活性部位,从基质获取的电子被供给到工作电极 90,此时如果氧化还原酶的取向性混乱,从氧化还原酶向工作电极 90 的电子传递效率就会变差。因此,在采用使氧化还原酶的取向性混乱的固定化方法的情况下,需要添加用于媒介氧化还原酶与工作电极 90 之间的电子授受的电子传递物质。因此,以现有方法固定氧化还原酶的生物传感器 9 需要电子传递物质,仅在这一点上对成本方面就是不利的。另外,作为电子传递物质,使用亚铁氰化钾等金属配位化合物,这些金属配位化合物中也存在有给人体带来不良影响的物质。因此,在以生物传感器 9 为首的分析用具中,不优选使用电子传递物质。

[0013] 专利文献 1 :日本特公平 8-10208 号公报

[0014] 非专利文献 1 :水谷文雄,《酵素薄膜修飾電極の センサーへの応用》,分析化学,日本分析化学学会,1999 年 9 月,第 48 卷,第 9 号, p809 ~ 821

## 发明内容

[0015] 本发明的课题在于:将氧化还原酶等蛋白质取向性良好地固定,以少的酶量适当并且成本上有利地表达活性。

[0016] 本发明的课题还在于:在生物传感器中,能够不使用电子传递物质而适当地对葡萄糖等基质的浓度进行测定。

[0017] 本发明的第一方面提供一种蛋白质固定化膜,其包括:细胞膜类似结构层;和固定在上述细胞膜类似结构层上且含有细胞色素或细胞色素复合体的蛋白质。

[0018] 本发明的第二方面提供一种蛋白质的固定化方法,其包括:在被固定化部件中的目的部位形成细胞膜类似结构层的第一步骤;和相对于上述细胞膜类似结构层,使含有细胞色素或细胞色素复合体的蛋白质自行组织化第二步骤。

[0019] 本发明的蛋白质固定化方法优选还包括在第一步骤之前进行并且在上述目的部位实施亲水处理的第三步骤。

[0020] 本发明的第三方面提供一种酶固定化电极,其包括:基材;和固定在上述基材上的含酶层,并且,上述含酶层包括:细胞膜类似结构层;和将在相对于上述细胞膜类似结构层自行组织化的状态下被固定的细胞色素作为亚单位的酶。

[0021] 本发明第四方面提供一种生物传感器,其包括:基板;和固定在上述基板上的含酶层,并且,上述含酶层包括:细胞膜类似结构层;和将在相对于上述细胞膜类似结构层自行组织化的状态下被固定的细胞色素作为亚单位的酶。

[0022] 本发明的生物传感器还包括:例如用于使试样移动的流路;和设置在流路内部的试剂部。

[0023] 本发明的生物传感器还包括:在流路中露出一部分,且用于向试样施加电压的工作电极和对电极。此时,细胞膜类似结构层的至少一部分形成在上述工作电极上。

[0024] 试剂部还可以形成为含有显色剂的试剂部。在该情况下,试剂部包括:例如含有显色剂的显色层;和含有细胞膜类似结构层和酶的含酶层。

[0025] 本发明的细胞膜类似结构层例如含有磷脂质聚合物。作为磷脂质聚合物,优选使用 2- 甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱聚合物。

[0026] 本发明的细胞膜类似结构层还优选导入有硅烷偶联剂。作为硅烷偶联剂，优选使用四乙氧基硅烷。

[0027] 本发明的酶等蛋白质例如是含有具有葡萄糖脱氢活性的  $\alpha$  亚单位和具有电子传递功能的细胞色素 C 的 CyGDH。

## 附图说明

[0028] 图 1 是表示本发明的第一实施方式的生物传感器的整体立体图。

[0029] 图 2 是图 1 所示的生物传感器的分解立体图。

[0030] 图 3 是沿图 1 的 III-III 线的截面图及其主要部分放大图。

[0031] 图 4 是本发明的第二实施方式的生物传感器的整体立体图。

[0032] 图 5 是沿图 4 的 V-V 线的截面图及其主要部分放大图。

[0033] 图 6 是表示在实施例 1 中，由 AFM 观察碳电极的表面状态的结果的 AFM 图像。

[0034] 图 7 是表示在实施例 1 中，由 AFM 观察在碳电极的表面上形成磷脂质聚合物层的状态的结果的 AFM 图像。

[0035] 图 8 是表示在实施例 1 中，由 AFM 观察将 CyGDH 固定在磷脂质聚合物层表面上的状态的结果的 AFM 图像。

[0036] 图 9 是表示在实施例 2 中使用的电流值测定装置的概略结构的示意图。

[0037] 图 10 将实施例 2 中的应答电流值的测定结果是以时程表示的曲线图。

[0038] 图 11 是表示实施例 2 中的电流值的测定结果与葡萄糖浓度的关系的曲线图。

[0039] 图 12 是表示现有技术中的生物传感器的一个例子的主要部分的截面图。

[0040] 符号说明

[0041] X1、X2 生物传感器

[0042] 1、5(生物传感器的)基板

[0043] 11(生物传感器的)工作电极

[0044] 12(生物传感器的)对电极

[0045] 14、51(生物传感器的)试剂部

[0046] 14A、50B(试剂部的)细胞膜类似结构层

[0047] 14B、50C(试剂部的)CyGDH 层

[0048] 4、8 毛细管(流路)

[0049] 51A(试剂部的)显色层

## 具体实施方式

[0050] 以下，参照附图说明本发明优选的实施方式，即第一实施方式和第二实施方式。

[0051] 首先，参照图 1 至图 3，说明本发明的第一实施方式。

[0052] 图 1 至图 3 所示的生物传感器 X1 为一次性产品，安装在浓度测定装置(图示略)中，用于测定血糖值。该生物传感器 X1 适合利用电化学的方法测定血糖值，具有在长方形的基板 1 上隔着隔板 2 叠层有盖 3 的形态。在生物传感器 X1 中，由各要件 1 ~ 3 规定沿基板 1 的长度方向(图中的 N1、N2 方向)延伸的毛细管 4。毛细管 4 用于利用毛细管现象使从导入口 40 导入的血液沿基板 1 的长度方向(图中的 N1、N2 方向)移动，并且保持导入的

血液。

[0053] 隔板 2 用于规定从基板 1 的上面 10 到盖 3 的下面 30 的距离, 即毛细管 4 的高度尺寸, 例如由双面胶带构成。该隔板 2 上形成有前端开口的缝隙 20。缝隙 20 用于规定毛细管 4 的宽度尺寸, 缝隙 20 前端的开口部分构成用于将血液导入毛细管 4 内部的导入口 40。

[0054] 盖 3 具有用于将毛细管 4 内部的气体排出至外部的排气口 30。该盖 3 例如由维尼纶或高结晶化 PVA 等润湿性高的热塑性树脂形成。

[0055] 如图 2 和图 3 明确地表示, 基板 1 例如由 PET 等绝缘树脂材料形成, 在其上面 10 形成有工作电极 11、对电极 12、绝缘膜 13 和试剂部 14。

[0056] 工作电极 11 和对电极 12 整体形成为 L 字状的形态, 更具体地讲, 工作电极 11 和对电极 12 的大部分沿基板 1 的长度方向 (图中的 N1、N2 方向) 延伸, 并且其端部 11a、12a 沿基板 1 的宽度方向 (图中的 N3、N4 方向) 延伸。另一方面, 工作电极 11 和对电极 12 的端部 11b、12b 构成用于与设置在浓度测定装置 (图示略) 上的端子接触的端子部。工作电极 11 和对电极 22 例如能够由使用碳糊的丝网印刷形成。工作电极 11 和对电极 12 的形成能够使用碳以外的导电性材料而进行, 还能够由旋转涂布、热转印、碳棒切片、蒸镀、溅射或 CVD 进行。

[0057] 绝缘膜 13 以露出工作电极 11 和对电极 12 的端部 11a、12a、11b、12b 的方式, 覆盖工作电极 11 和对电极 12 的大部分。该绝缘膜 13 具有用于使工作电极 11 和对电极 12 的端部 11a、12a 露出的开口部 13a。该开口部 13a 规定用于形成试剂部 14 的区域, 形成为沿基板 1 的长度方向 (图中的 N1、N2 方向) 延伸的长矩形。

[0058] 绝缘膜 13 能够通过使用含有拨水性高的材料的油墨的丝网印刷, 或者使用感光性树脂材料的光刻形成。

[0059] 在绝缘膜 13 的开口部 13a 中, 以工作电极 11 和对电极 12 的端部 11a、12a 彼此架桥的方式设置试剂部 14。该试剂部 14 具有细胞膜类似结构层 14A 和 CyGDH 层 14B。

[0060] 细胞膜类似结构层 14A 用于在保持取向性的状态下固定 CyGDH。将含有磷脂质聚合物的溶液经过基板 1、工作电极 11 和对电极 12 的绝缘膜 13 的开口部 13a 滴到露出的部分 14' (以下称为“露出部分 14'”), 之后使之干燥, 由此能够形成该细胞膜类似结构层 14A。

[0061] 作为磷脂质聚合物, 例如可以使用 2- 甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱 (MPC) 聚合物。作为 MPC 聚合物, 可以使用将 MPC 单独聚合或者将 MPC 与甲基丙烯酸酯 (例如, 甲基丙烯酸丁酯) 等疏水性聚合物共聚而得到的聚合物。

[0062] 用于形成细胞膜类似结构层 14A 的磷脂质聚合物只要是含有分子内具有与构成细胞膜的磷脂质类似的结构的单体单元的聚合物即可, 也能够使用 MPC 聚合物以外的聚合物。

[0063] 另外, 作为磷脂质聚合物, 优选使用导入有硅烷偶联剂的磷脂质聚合物。由此能够提高磷脂质聚合物对露出部分 14' 的结合性。

[0064] 另外, 当形成细胞类似结构层 14A 的时候, 优选事先对露出部分 14' 进行亲水处理。由此, 向露出部分 14' 导入羟基、羧基等亲水基, 该亲水基与硅烷偶联剂结合, 由此能够使磷脂质聚合物更牢固地固定在露出部分 14' 上。

[0065] 在此, 聚合物中的硅烷偶联剂的量例如相对于聚合物成分 100 重量份, 为 10 ~ 500

重量份。作为硅烷偶联剂,例如可以举出四乙氧基硅烷、乙烯基三氯硅烷、乙烯基三(2-甲氧基乙氧基)硅烷、 $\gamma$ -甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷、 $\gamma$ -甲基丙烯酰氧基丙基三乙氧基硅烷、 $\beta$ -(3,4-环氧环己基)乙基三甲氧基硅烷、 $\gamma$ -环氧丙氧基丙基三乙氧基硅烷、 $\gamma$ -氨基丙基三乙氧基硅烷、N-苯基- $\gamma$ -氨基丙基三甲氧基硅烷、 $\gamma$ -氯丙基三甲氧基硅烷、或 $\gamma$ -巯基丙基三甲氧基硅烷,这些硅烷偶联剂可以单独使用,也可以并用多种。

[0066] 另一方面,露出部分14'的亲水处理能够由公知的各种方法进行。作为在本发明中能够采用的亲水处理,可以列举VUV处理、UV处理、电晕放电处理、或等离子体处理等。

[0067] CyGDH层14B是将CyGDH自行组织地固定在细胞膜类似结构层14A上而得到的。另外,图3中,描绘了将CyGDH固定在细胞膜类似结构层14A表面上的形态,这是为了说明本案而简单表示的示意图。即,本发明的发明人等确认CyGDH自行组织地固定在细胞膜类似结构层14A上,但是在现阶段还没有确认CyGDH以何种状态固定在细胞膜类似结构层14A上,另外,由于后述的源自属于洋葱伯克霍尔德菌(Burkholderia cepacia)的微生物的CyGDH是跨膜蛋白质,所以,CyGDH未必如图3所示只固定在细胞膜类似结构层14A的表面,也包括CyGDH贯通细胞膜类似结构层14A而固定在细胞膜类似结构层14A中的可能性。

[0068] CyGDH相对于细胞膜类似结构层14A的自行组织的固定能够通过将例如在露出部分14'形成有细胞膜类似结构层14A的基板1浸渍在含有CyGDH的酶溶液中后,或者将上述酶溶液向细胞膜类似结构层14A喷雾后,使其干燥而进行。

[0069] 在将CyGDH自行组织地固定在细胞膜类似结构层14A上的情况下,由后述的AFM图像(参照图8)能够推测,CyGDH在具有取向性的状态下被固定。即,CyGDH在下述的状态下被固定在细胞膜类似结构层14A上: $\alpha$ 亚单位的活性部位位于试剂部14的表层,另一方面,细胞色素C位于接近露出部分14'(工作电极11)的位置或者与其接触。

[0070] 其中,本发明中使用的CyGDH指的是至少包括具有葡萄糖脱氢活性的 $\alpha$ 亚单位和具有电子传递功能的细胞色素C的物质,也包括还具有 $\alpha$ 亚单位和细胞色素C以外的亚单位的物质。这样的CyGDH的例子公开在国际公开第W002/36779号小册子中。在先的国际申请记载的CyGDH源自属于洋葱伯克霍尔德菌(Burkholderia cepacia)的微生物,在还原条件下的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的分子量约为60kDa,并且,含有以FAD作为辅基且具有葡萄糖脱氢活性的 $\alpha$ 亚单位,和在还原条件下的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的分子量约为43kDa的、具有电子传递功能的细胞色素C。另外,本发明的CyGDH也包括利用将编码取自属于洋葱伯克霍尔德菌的微生物的CyGDH基因导入的转化体而得到的物质。

[0071] 源自属于洋葱伯克霍尔德菌的微生物的CyGDH为跨膜蛋白质。即,由于先前的源自微生物的CyGDH原本是存在于细胞膜中的物质,所以在使用的这样的CyGDH的情况下,CyGDH能够相对于细胞膜类似结构层14A自行组织地、并且在与存在于细胞膜的情况相同地具有取向性的状态下固定。这样的CyGDH自行组织的固定化不限于源自属于洋葱伯克霍尔德菌的CyGDH,在使用本来存在于细胞膜中的CyGDH的情况下就能够达到。

[0072] 这样的生物传感器X1安装在浓度测定装置(图示略)中后,通过生物传感器X1的导入口40,将血液供给毛细管4,由此在浓度测定装置(图示略)中能够自动测定血糖值。

[0073] 向生物传感器X1供给血液可以在将生物传感器X1安装在浓度测定装置(图示略)中之前或者在安装之后的任意时候进行。通常,通过在切开被检者的皮肤使血液流出后,使该血液附着在生物传感器X1的导入口40而进行。

[0074] 在将生物传感器 X1 安装在浓度测定装置(图示略)的情况下,生物传感器 X1 的工作电极 11 和对电极 12 与浓度测定装置的端子(图示略)接触。另一方面,在生物传感器 X1 中,附着在导入口 40 的血液通过在毛细管 4 中产生的毛细管现象向排气口 30 移动,填充到毛细管 4 中。

[0075] 在毛细管 4 中,CyGDH 与血液中的葡萄糖发生特异反应,从葡萄糖中获取电子。其另一方面,在利用工作电极 11 和对电极 12 向血液施加电压的时候,由 CyGDH 获取的电子供给到工作电极 11。这样,在浓度测定装置中,在对工作电极 11 和对电极 12 施加电压时,例如将对工作电极 11 的电子供给量作为应答电流值进行测定,由此能够基于应答电流值运算出血糖值。

[0076] 在生物传感器 X1 中,CyGDH 以 α 亚单位的活性部位位于试剂部 14 的表面的方式,在 CyGDH 具有取相性的状态下被固定。因此,在试剂部 14 中,能够有效地从葡萄糖中获取电子。由此,在生物传感器 X1 中,目的活性表达所需要的 CyGDH 的量变少,从而能够在成本上有利地表达目的活性。

[0077] 另外,由于 CyGDH 具有取向性而被固定,所以能够抑制每个生物传感器 X1 中的制剂部 14 含有的 CyGDH 的量和活性部位的方位(位置)产生不均衡。由此能够抑制每个生物传感器 X1 的灵敏度不均衡的产生,从而能够进行适当的血糖值测定。

[0078] 另外,在生物传感器 X1 中,由于 CyGDH 具有取向性而被固定,所以细胞色素 C 在位于接近露出部分 14'(工作电极 11)的位置或与其接触的状态下存在。因此,在试剂部 14 中,能够将从葡萄糖中获取的电子有效地供给工作电极 11。由此,在生物传感器 X1 中,能够不使用金属配位化合物这样的电子传递物质而得到适当的应答电流。

[0079] 下面,参照图 4 和图 5,对本发明的第二实施方式进行说明。

[0080] 图 4 和图 5 所示的生物传感器 X2 的结构适于通过光学方法测定血糖值,在这一点上与先前说明的生物传感器 X1(参照图 1 至图 3) 不同。

[0081] 生物传感器 X2 具有在长方形的基板 5 上隔着一对隔板 6 叠层有盖 7 的形态。在生物传感器 X2 中,由各要素 5~7 规定沿基板 5 的长度方向(图中的 N1、N2 方向)延伸的毛细管 8。毛细管 8 用于利用毛细管现象使从导入口 80 导入的血液沿基板 5 的长度方向(图中的 N1、N2 方向)移动,并且保持被导入的血液。

[0082] 在毛细管 8 的内部形成有试剂部 51。该试剂部 51 在显色层 51A 上形成有细胞膜类似结构层 51B 和 CyGDH 层 51C。

[0083] 显色层 51A 含有显色剂,例如能够通过将含有显色剂的溶液涂布在基板 5 的目的部位后使之干燥而形成。

[0084] 其中,作为在本发明中能够使用的显色剂,例如能够举出 MTT(3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-四唑溴化物)(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)、INT(2-(4-碘苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-苯基-2H-四唑氯化物)(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride)、WST-4(2-(4-碘苯基)-3-(2,4-二硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯基)-2H-四唑,单钠盐)(2-(4-iodophenyl)-3-(2,4-dinitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 和 4AA(4-氨基安替比林)(4-Aminoantipyrine)

[0085] 细胞膜类似结构层 51B 和 CyGDH 层 51C 能够与先前说明的生物传感器 X1( 参照图 1 至图 3) 的情况相同地形成。

[0086] 在该生物传感器 X2 中,试剂部 51 含有细胞膜类似结构层 51B 和 CyGDH 层 51C,与先前说明的生物传感器 X1( 参照图 1 至图 3) 的情况相同地形成,但是,细胞膜类似结构层 51B 处于与显色层 51A 接触的状态。因此,试剂部 51 在下述状态下被固定在细胞膜类似结构层 51B 上 :CyGDH 具有取向性,即, CyGDH 中的  $\alpha$  亚单位的活性部位存在于表层,另一方面,CyGDH 中的细胞色素 C 与显色层 51A 接触,或者存在于显色层 51A 的附近。因此,在生物传感器 X2 中,也能够达到与先前说明的生物传感器 X1( 参照图 1 至图 3) 同样的效果。

[0087] 本发明不限定于上述实施方式,可以有各种变形。例如,本发明不限于作为一次性产品构成的生物传感器,例如,也能够适用于:用于至少将电极部分埋入人体连续地测定血糖值的生物传感器;用于测定葡萄糖以外的基质浓度的生物传感器;或者用于测定葡萄糖等的基质浓度的酶电极。

[0088] 实施例 1

[0089] 在本实施例中,在 PET 基材的表面上形成碳电极、磷脂质聚合物层和 CyGDH 层,另一方面,使用原子力显微镜 (AFM) (商品名“D-3100”;Digital Instruments 公司生产) 观察在这些层形成前后的表面性状。

[0090] ( 碳电极表面的观察 )

[0091] 碳电极由使用日本アンチソソン公司生产的碳墨的丝网印刷形成。碳电极的 AFM 图像表示在图 6 中。由图 6 可知,碳电极层的表面为碳颗粒 (平均粒径为 100nm 左右) 显露出来的比较大的凹凸面。

[0092] ( 磷脂质聚合物层表面的观察 )

[0093] 磷脂质聚合物层通过对碳电极的表面进行 VUV 处理 (亲水处理) 之后,在碳电极的表面涂布 MPC 聚合物溶液,使之干燥而形成。另外,VUV 处理通过使用“MECL-M3-750”(M. D. Excimer 公司生产),在大气中,将波长为 172nm 的受激准分子激光,以 1mm 的照射距离,向碳电极层的表面照射 180 秒钟而进行。作为 MPC 聚合物溶液,使用导入有作为硅烷偶联剂的四乙氧基硅烷的 MPC 聚合物 (商品名“LIPIDURE”,日本油脂公司生产)。

[0094] 形成磷脂质聚合物层后的 AFM 图像表示在图 7 中。由图 7 可知,在磷脂质聚合物层的表面显露出聚合物中的磷脂质部位,但由于磷脂质部位的直径为 2 ~ 3nm,小于碳颗粒,所以相比于碳电极层,磷脂质聚合物层的表面为平滑表面 (参照图 6)。

[0095] ( CyGDH 层表面的观察 )

[0096] CyGDH 通过将形成有磷脂质聚合物层的碳电极浸渍在 CyGDH 溶液中 10 分钟而形成。CyGDH 溶液中的 CyGDH 浓度在活性基准中为 100U/  $\mu$  L。形成 CyGDH 层之后的 AFM 图像表示在图 8 中。

[0097] 由图 8 可知,确认在磷脂质聚合物层的表面存在规则排列配置的直径为 6 ~ 30nm 左右的块状物 (CyGDH)。即,相对于磷脂质聚合物,以至少 CyGDH 的一部分在表层显露的方式固定 CyGDH。另外,由于块状物被规则的排列配置,所以推测 CyGDH 具有取向性而被固定在磷脂质聚合物层上。

[0098] 实施例 2

[0099] 在本实施例中,分别对通过磷脂质聚合物层固定 CyGDH 的电极 (本案电极) 和不

通过磷脂质聚合物层固定 CyGDH 的电极（比较电极）研究应答性。

[0100] 作为本案电极，与实施例 1 相同，使用在碳电极上形成磷脂质聚合物层之后，固定 CyGDH 而得的电极。

[0101] 另一方面，比较电极除没有形成磷脂质聚合物层这一点外，与本案电极同样地形成。

[0102] 构筑图 9 所示的电流测定装置 Y，由该电极值测定装置 Y 向葡萄糖溶液施加电压，将本案电极和比较电极的应答性作为此时的应答电流值进行评价。

[0103] 电流值测定装置 Y 包括工作电极 Y1、参照极 Y2 和对电极 Y3，这些电极 Y1～Y3 与恒电位仪 Y4 连接。采用该电流值测定装置 Y，将电极 Y1～Y3 浸渍在葡萄糖溶液中，能够向葡萄糖溶液施加电压，另外，能够测定电压施加时的应答电流值。在此，工作电极 Y1 是由先前说明的方法形成的本案电极或比较电极，参照电极 Y2 是银 / 氯化银电极（商品名“RE-1B”，BAS 公司生产），对电极 Y3 是铂电极。

[0104] （线性扫描伏安法）

[0105] 在本实施例中，在研究本案电极和比较电极的应答性之前，分别针对浓度不同的多种葡萄糖溶液，将本案电极作为工作电极 Y1，使用先前说明的电流值测定装置 Y，进行线性扫描伏安法测定。

[0106] 在该测定中，扫描电压取 100mV/sec，在 -400mV～+700mV 的范围内测定应答电流值。作为葡萄糖溶液，使用 0mg/dL、50mg/dL、100mg/dL、200mg/dL、400mg/dL 和 600mg/dL 的溶液。其结果，在 +100～+700mV 的范围内，可以发现与葡萄糖溶液的浓度的差对应的应答电流值的差。根据该结果，在以下进行的应答电流值的测定中，将向葡萄糖溶液施加的电压设定在 +600mV。

[0107] （应答性）

[0108] 本案电极和比较电极的应答性是通过如下方式测定的：分别针对浓度不同的多种葡萄糖溶液，将本案电极或比较电极作为工作电极 Y1，使用先前说明的电流值测定装置 Y，测定应答电流值的时程。应答电流值测定时的施加电压如上述取 +600mV，作为葡萄糖溶液，使用 0mg/dL、50mg/dL、100mg/dL、200mg/dL、400mg/dL 和 600mg/dL 的溶液。对于各自的葡萄糖溶液的应答电流值的时程表示在图 10 中。另外，从测定开始 1 秒后的应答电流值与葡萄糖浓度的关系表示在图 11 中。

[0109] 由图 10 和图 11 可知，采用本案电极能够测定  $\mu$  级的应答电流值，而另一方面，采用比较电极只能测定 n 级的应答电流值。即，采用比较电极能够得到与在不使用现有技术报告的金属配位化合物等电子传递物质的系统中的应答电流值的测定结果（n 级）相同的结果。其另一方面，采用本案电极能够得到远大于现有技术的报告的  $\mu$  级应答电流值，确认本案电极的应答性（灵敏度）高。

[0110] 另外，由图 10 和图 11 可知，在使用本案电极的情况下，葡萄糖浓度的差异能够作为应答电流值的差异而被适当地反映。因此，在使用本案电极的情况下，至少在本实施例中测定应答电流值的葡萄糖浓度的范围（0～600mg/dL）内，能够适当地测定葡萄糖浓度。

[0111] 这样，通过磷脂质聚合物固定 CyGDH 的本案电极即使不使用金属配位化合物等电子传递物质，也具有用于测定葡萄糖浓度的充分的应答性（灵敏度）。因此，采用本案电极不但能够不使用电子传递物质而适当地测定葡萄糖浓度（例如血糖值），而且，由于不需要

使用电子传递物质,所以即使埋入人体使用,对人体也没有不良影响。其结果,本发明能够没有问题地适用于为了埋入人体连续测定血糖值而使用的生物传感器。

[0112] 另外,在本案电极中采用的 CyGDH 的固定化方法,即磷脂质聚合物溶液的滴加和向 CyGDH 溶液的浸渍是极其简单的操作,其方法也能够适当地适用于以  $\mu$  TAS 为代表的具有微细流路的生物传感器。在该情况下,在微细流路中形成的磷脂质聚合物层和 CyGDH 层是极其薄的层,所以即使形成这些层,也不会显著地妨碍试样在微细流路中的移动。因此,即使在微细流路中的大部分形成由磷脂质聚合物层和 CyGDH 层构成的试剂部,也不会产生任何问题。因此,在相对于微细流路遍及广泛的范围形成试剂部,由此能够改善作为  $\mu$  TAS 缺点的灵敏度低的问题,从而能够提供灵敏度高的  $\mu$  TAS。

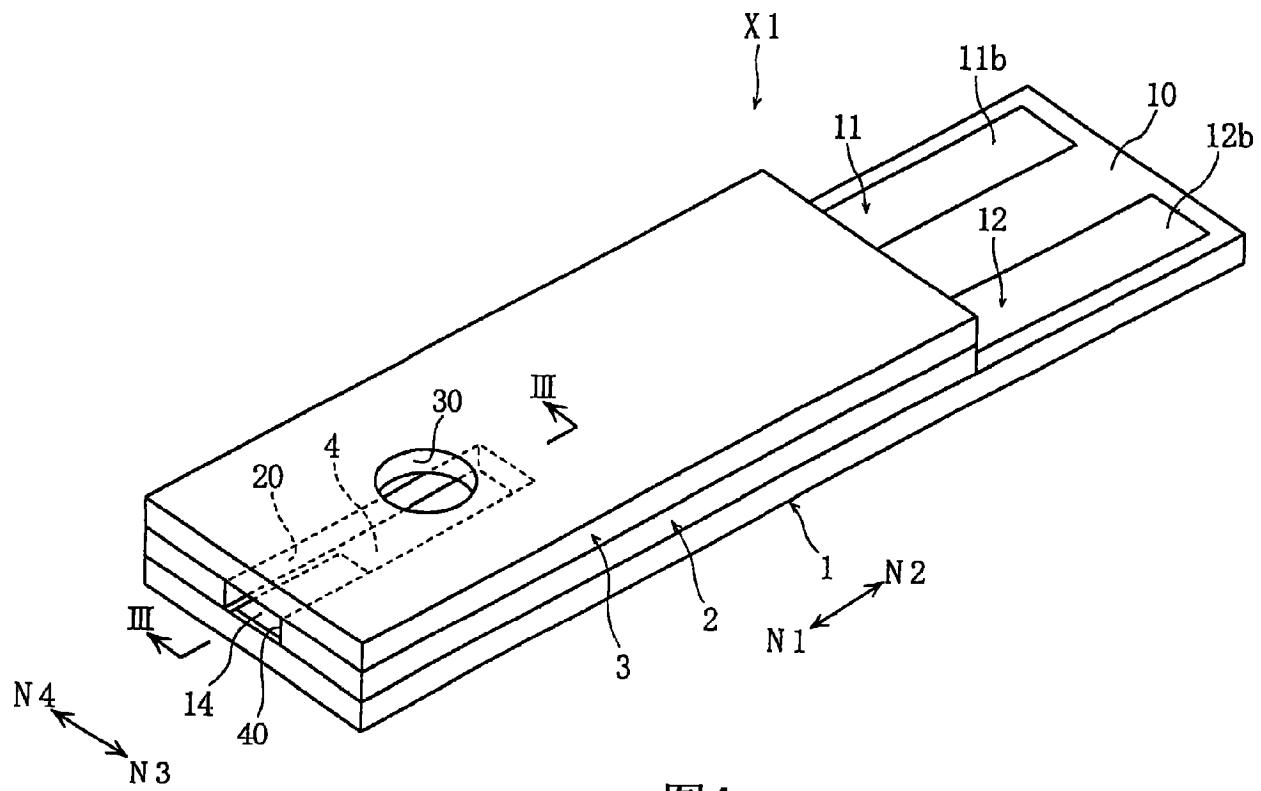


图1

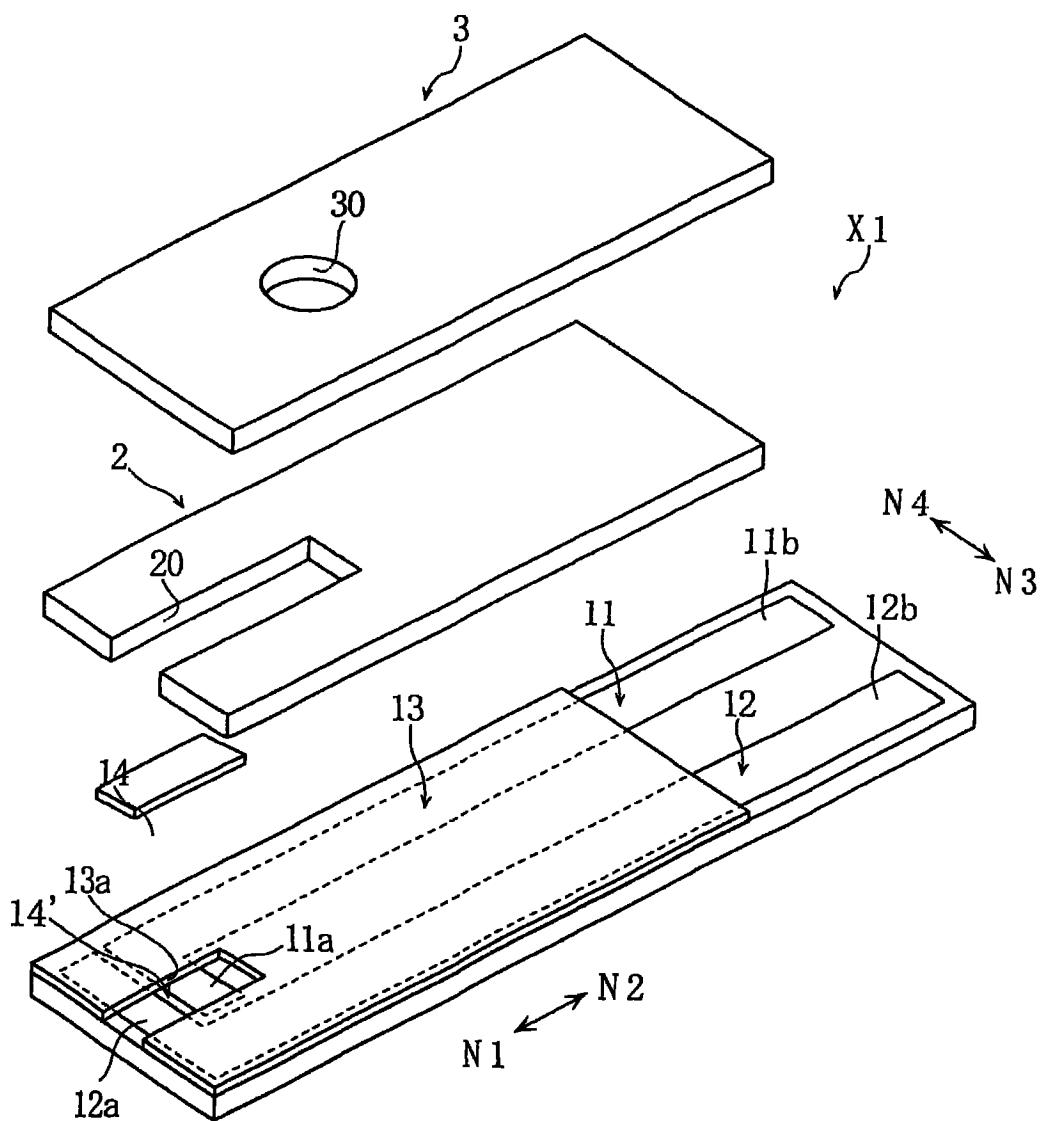


图2

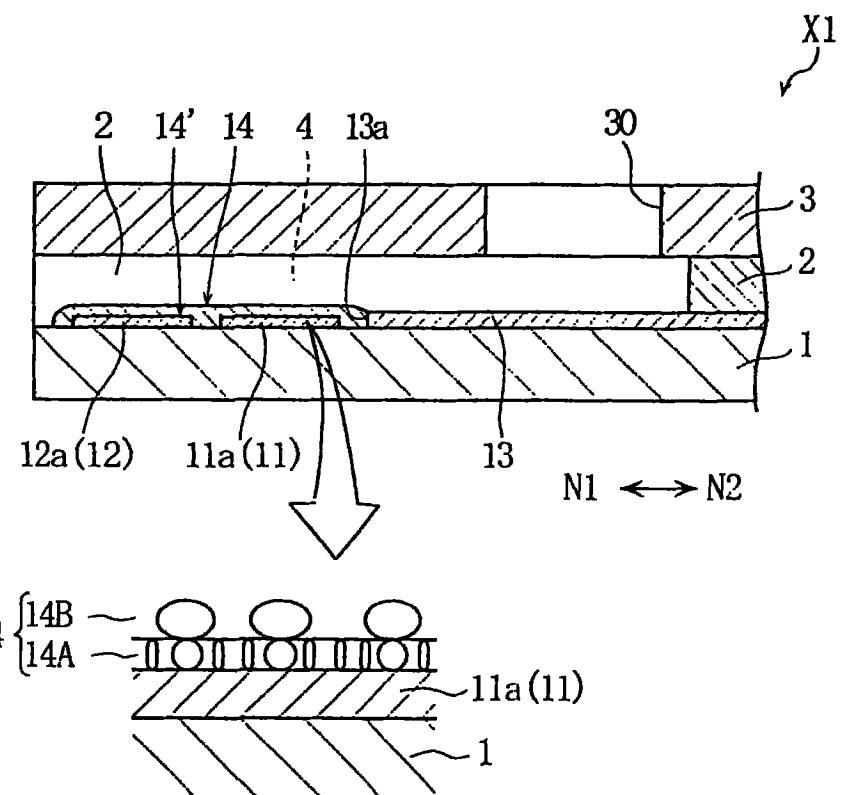


图3

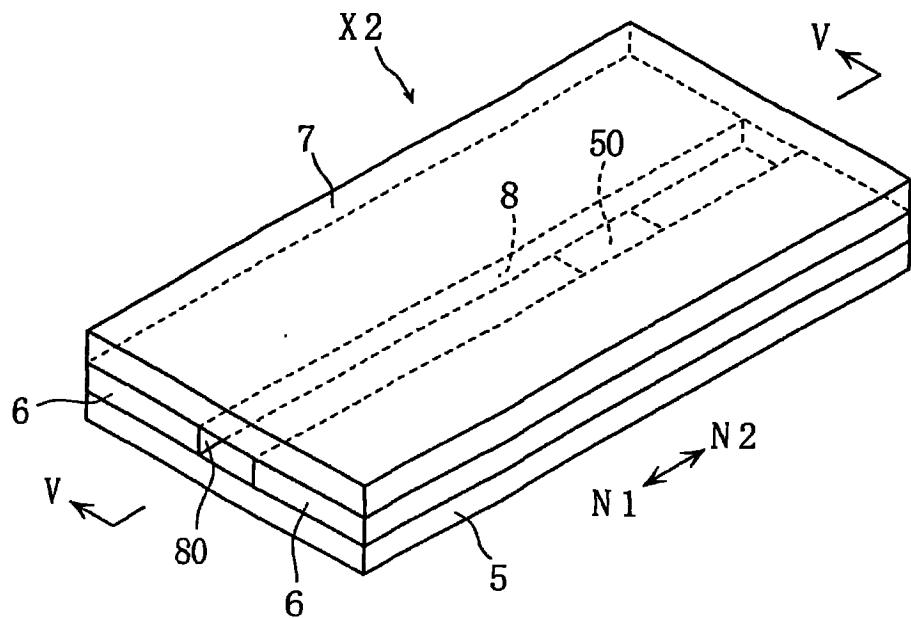


图4

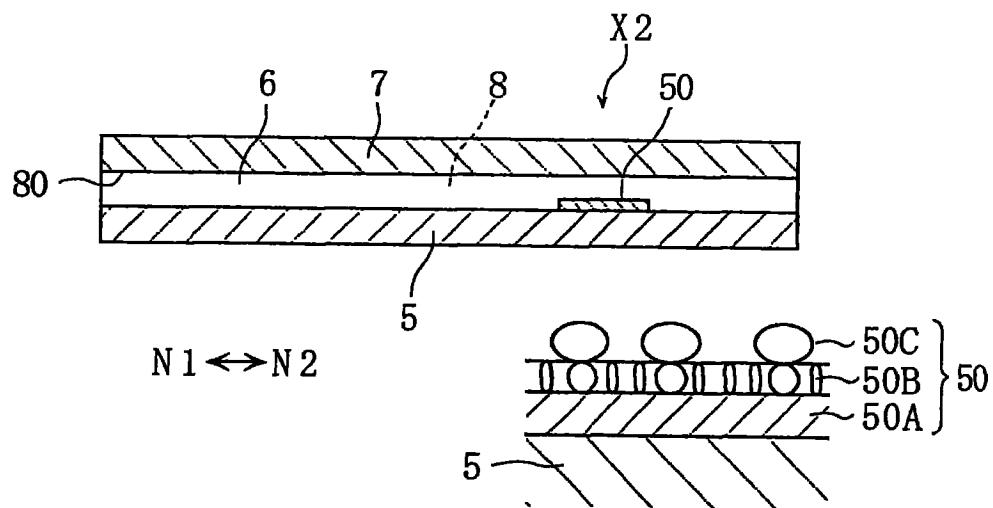


图5

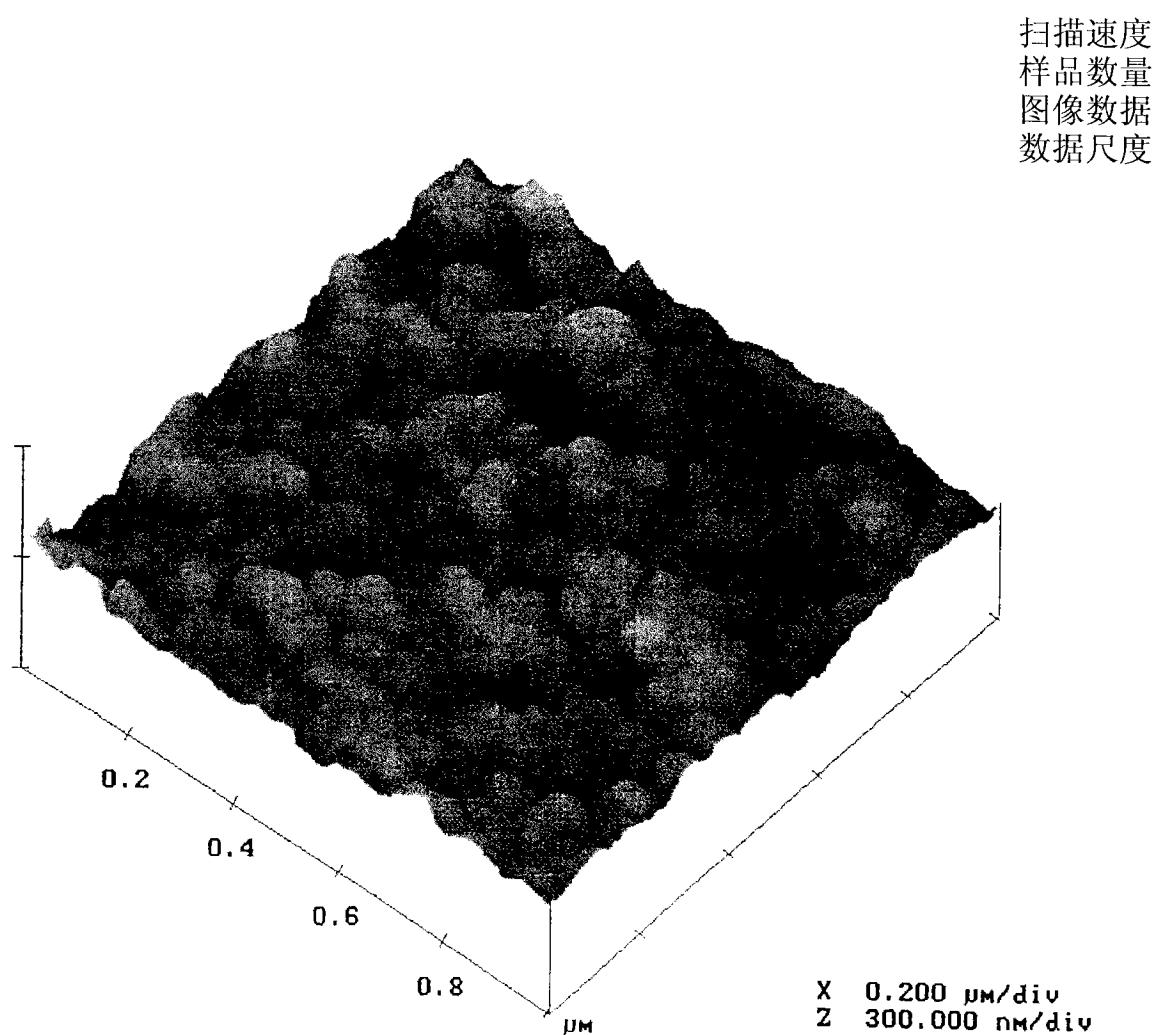


图6

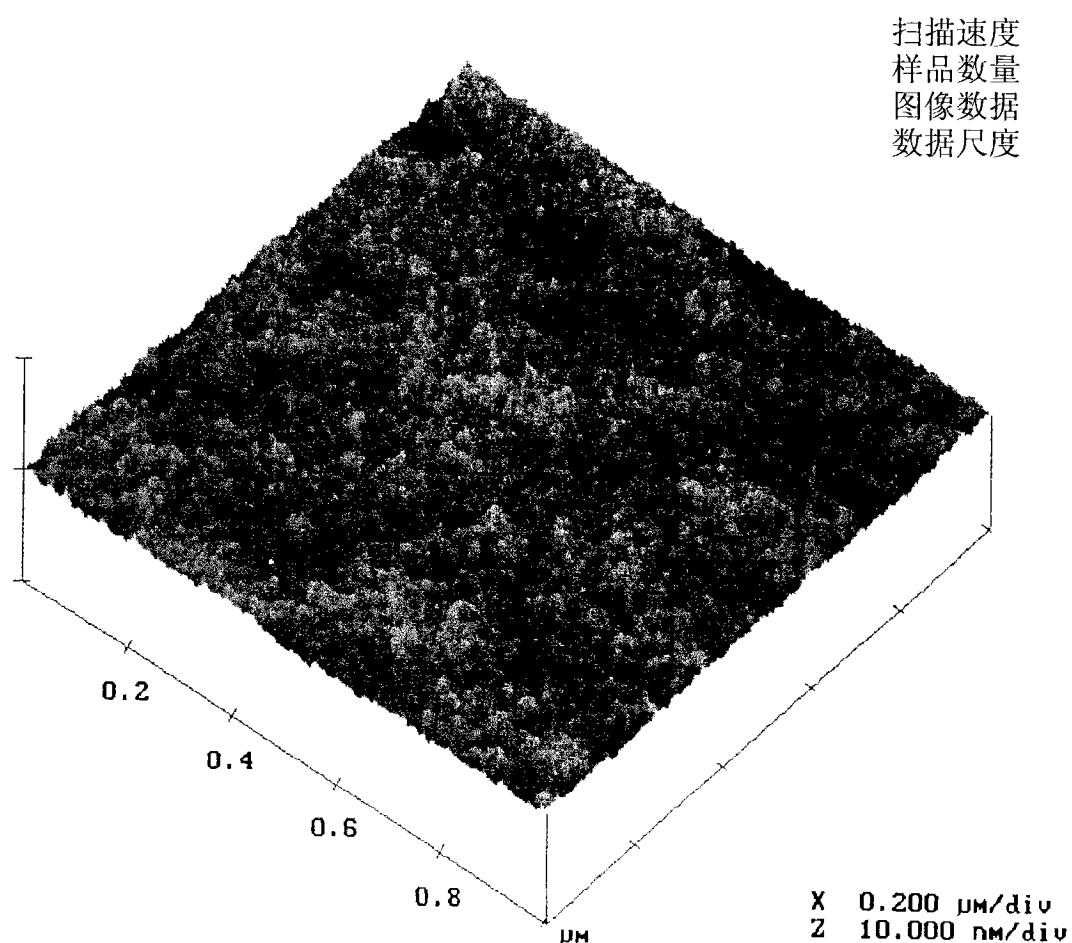


图7

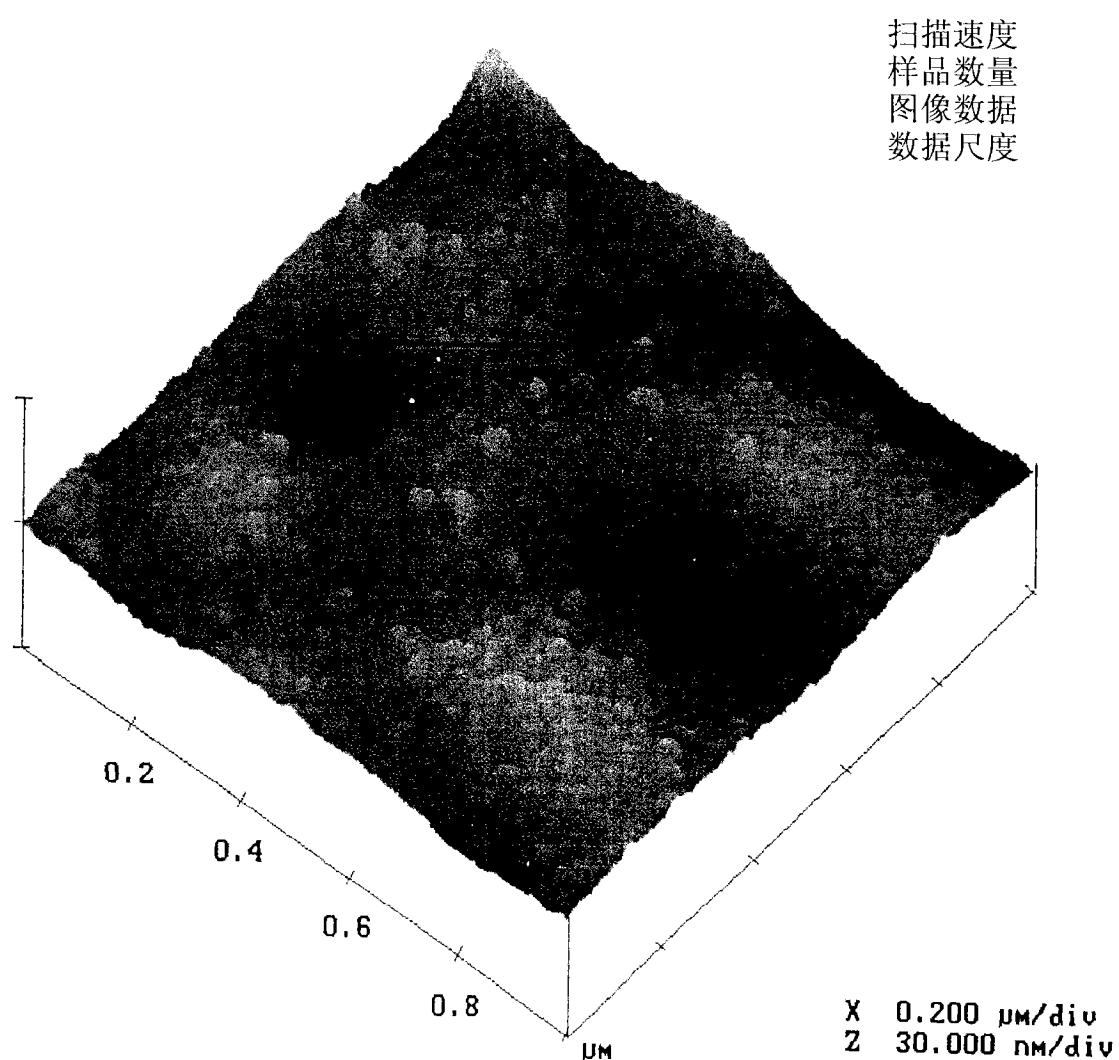


图8

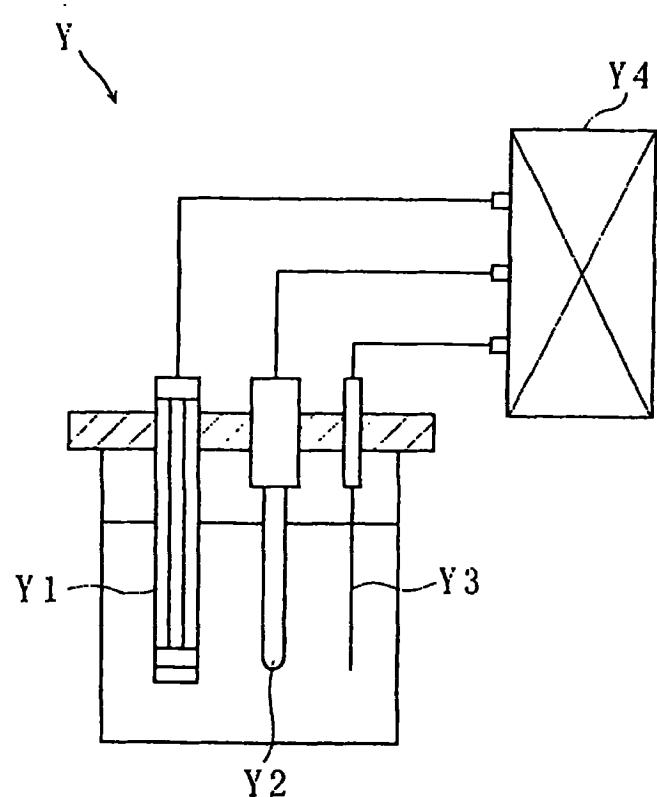
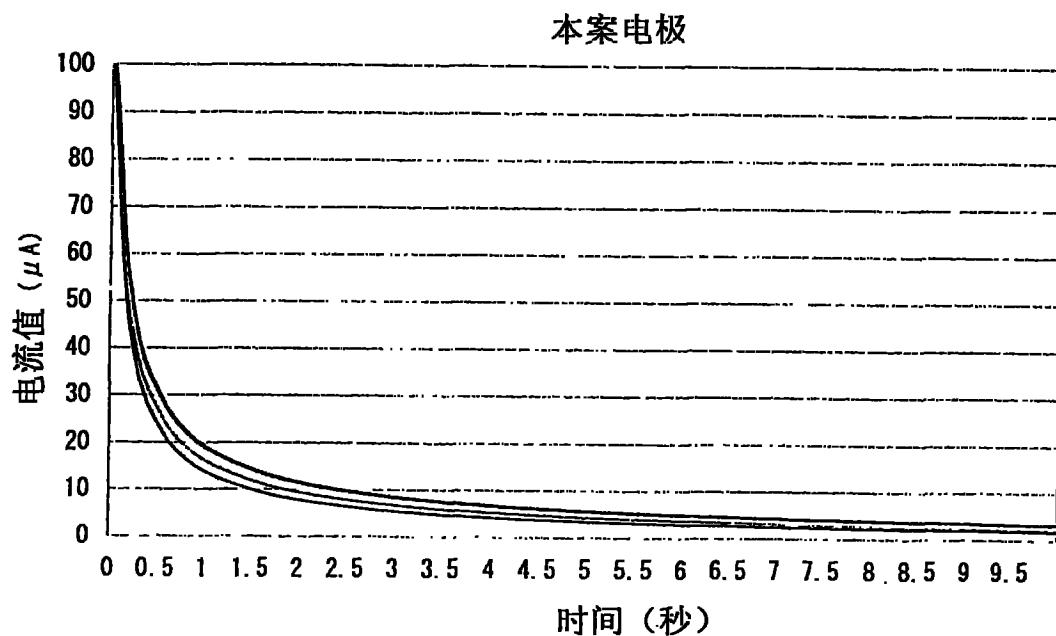


图9

(a)



(b)

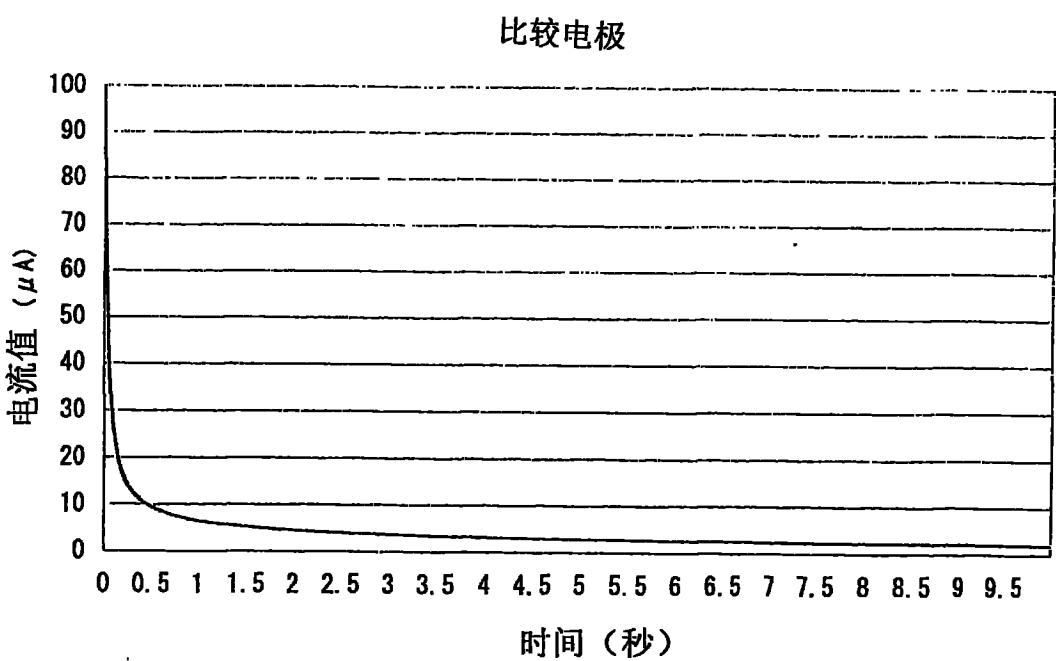


图10

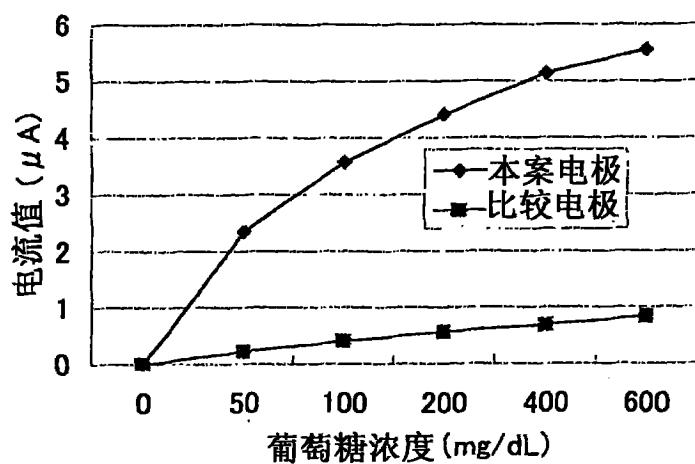


图11

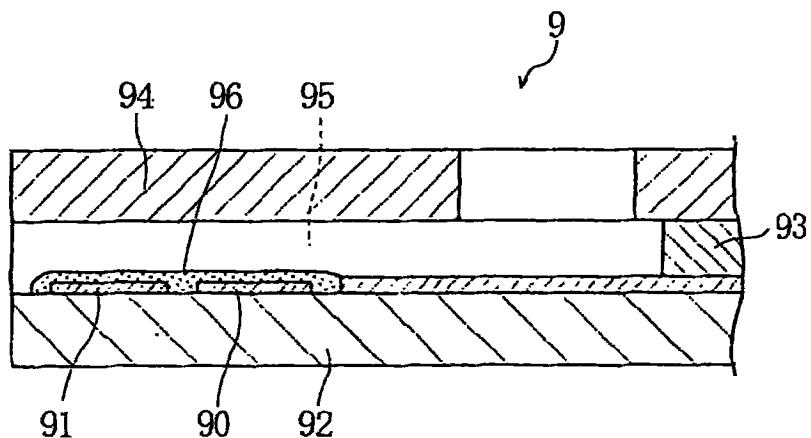


图12