

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510112801.8

[43] 公开日 2006年3月22日

[11] 公开号 CN 1749744A

[22] 申请日 2001.4.6

[21] 申请号 200510112801.8

分案原申请号 01822967.0

[30] 优先权

[32] 2001. 1. 4 [33] US [31] 09/754,858

[71] 申请人 台欣生物科技研发股份有限公司

地址 台湾苗栗县

[72] 发明人 L·金波 H·汤玉

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 赵蓉民 路小龙

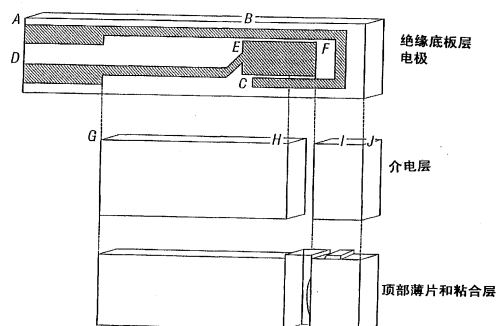
权利要求书 5 页 说明书 28 页 附图 10 页

## [54] 发明名称

具有改善加样性能的生物传感器

## [57] 摘要

本发明涉及具有改善的加样和测试性能的生物传感器，以及涉及这些生物传感器在液态样本中检测分析物或酶的用途，更优选地是定量测定分析物或酶的用途。尤其是，本发明提供了一种具有加样反应室的生物传感器，这促进了加样的速度和一致性，特别是通过毛细管流的小剂量加样。本发明还提供了具有倍增电路的生物传感器，这导致改善了测试浓度和精确度。进一步提供了用该生物传感器测试分析物或酶的方法。



1. 一种用于液态样本电化学分析的生物传感器，所述生物传感器包括：
- a) 一个有第一端和第二端的绝缘底板；
  - b) 一个位于所述绝缘底板上的电极系统，所述电极系统包括一个工作电极、一个反电极，和两个参比电极，所述工作电极、反电极和参比电极有导电导线将所述电极与所述底板第一端的电化学测量值的读出装置相连接，所述每一个参比电极与所述工作电极或反电极成对角位，所述工作电极/反电极、工作电极/参比电极、和参比电极/参比电极之间有缝隙空间，所述工作电极和与所述工作电极成对角位的第一个参比电极构成第一个闭合电路，所述反电极和与所述反电极成对角位的第二个参比电极构成第二个闭合电路，所述第一个电路和第二个电路连接构成第三个电路，这样只有当所述第一个和第二个电路同时关闭时所述第三个电路才关闭。
2. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中绝缘底板包括乙烯基聚合物或聚酰亚胺 (polyimide)、聚酯、尼龙、硝化纤维素或它们的组合。
3. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中工作电极、反电极和参比电极用基本上相同的材料制成。
4. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中参比电极与工作电极或反电极之间的间隙保持基本上恒定。
5. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中工作电极的表面面积与反电极的表面面积基本上相同。
6. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中电极系统被丝网印刷在绝缘底板上。
7. 如权利要求 6 所述的生物传感器，其中工作电极、反电极和参比电极含有炭膏，电极的导电导线含有导电银膏。

8. 如权利要求 1 所述的生物传感器, 其中除了通向导电导线的一侧, 参比电极的所有侧面被工作电极和反电极包围。

9. 如权利要求 1 所述的生物传感器, 其中参比电极被分开尽可能远的距离, 既不与工作电极接触也不与反电极接触。

5 10. 如权利要求 1 所述的生物传感器, 其中工作电极、反电极和参比电极的至少一部分和这些电极之间的间隙形成反应区, 所述反应区含有一种催化涉及被分析的分析物的反应的酶, 或包括一种参与由被分析的酶催化的反应的底物。

10 11. 如权利要求 10 所述的生物传感器, 所述生物传感器进一步在反应区包括一种电子转移介体。

12. 如权利要求 10 所述的生物传感器, 其中反应区是垂直于导电导线的电极系统的完全横截面, 反应区通过用介电材料构成的所述层覆盖非反应区来限定, 而且该生物传感器还包括一个加样反应室, 其中所述室的底部是反应区, 所述室的顶部是个至少覆盖着反应区的盖  
15 子, 所述顶部在反应区上方有一个用于加样的开口, 垂直于所述导电导线的所述室的两侧壁是由介电材料构成的所述层构成, 平行于所述导电导线的所述室的两侧壁是敞开的, 留作通气孔。

13. 如权利要求 12 所述的生物传感器, 其中介电材料是乙烯基聚酯、聚酰亚胺或它们的组合。

20 14. 如权利要求 12 所述的生物传感器, 其中临近第一端的介电材料的厚度基本上高于临近第二端的介电材料的厚度。

15. 如权利要求 14 所述的生物传感器, 其中临近第一端的介电材料的厚度是临近第二端的介电材料厚度的大约三倍。

25 16. 如权利要求 12 所述的生物传感器, 其中加样反应室的顶部是整个生物传感器盖子的相应部分。

17. 如权利要求 16 所述的生物传感器, 其中整个生物传感器盖子

是粘附于非反应区的薄片，顶部的开口是所述薄片上钻开的孔。

18. 如权利要求 17 所述的生物传感器，其中薄片上的钻孔有一段加样槽的弓形部分伸向反应区，形成凸面，所述凸面作为样本液进入反应区的通道，凸面的弓形部分对样本液快速吸入提供了辅助推进作用。

19. 如权利要求 12 所述的生物传感器，其中绝缘底板是透明的，由此液态样本被引入透明绝缘底板的反面，通过透明绝缘底板就可以监测液态样本的运动。

20. 如权利要求 12 所述的生物传感器，所述生物传感器进一步在反应区包括一种电子转移介体。

21. 如权利要求 20 所述的生物传感器，其中电子转移介体选自二茂铁和它的衍生物、钼络合物、四硫富瓦烯、吩嗪乙基硫酸酯、苯醌和六氰高铁酸盐。

22. 如权利要求 12 所述的生物传感器，其中临近第二端的非反应区被分成两个边角部分和一个中间部分，中间部分通过如下方式成为反应区的一部分，即或者通过不用介电材料构成的所述层覆盖中间部分，或者通过使边角部分的介电材料厚度基本上高于中间部分介电材料的厚度，由此反应区就占据了一个 T 形区域，该区域包括垂直于所述导电导线的完全横截面，和一个平行于导电导线的从横截面到第二端边缘的条状区域。

23. 如权利要求 22 所述的生物传感器，其中临近第一端的介电材料的厚度和临近第二端的两个边角部分的厚度是单位厚度的大约三倍，临近第二端的中部介电材料的厚度是单位厚度的大约一倍。

24. 一种测试液态样本中分析物或酶的方法，这种方法包括：

a) 在适当条件下，用带有适宜的电子转移介体的权利要求 10 中的生物传感器接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，从而，样本液中的分析物，如果有的话，参与生物传感器反应区含有的酶催化的

反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区含有的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；

5 b) 检测 a)步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其中与生物传感器接触的液态样本的量是从大约 1.5 微升到大约 3.0 微升。

26. 如权利要求 24 所述的方法，其中将被检测的分析物是葡萄糖。

10 27. 如权利要求 26 所述的方法，其中生物传感器反应区含有的酶是葡萄糖氧化酶，检测中所用的电子转移介体是铁氰化钾。

28. 一种测试液态样本中分析物或酶的方法，这种方法包括：

15 a) 在适当条件下，用权利要求 11 中的生物传感器接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，从而，样本液中的分析物，如果有的话，参与生物传感器反应区含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区含有的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与生物传感器反应区携带的电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；

b) 检测 a)步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

20 29. 一种测试液态样本中分析物或酶的方法，这种方法包括：

25 a) 在适当条件下，用带有适宜的电子转移介质的权利要求 12 中的生物传感器接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，从而，样本液中的分析物，如果有的话，参与生物传感器反应区含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区含有的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；

b) 检测 a)步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

30. 一种测试液态样本中分析物或酶的方法，这种方法包括：

a) 在适当条件下，用带有适宜的电子转移介体的权利要求 22 中的生物传感器接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，从而，样本液中的分析物，如果有的话，参与生物传感器反应区含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区含有的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；

b) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

10

## 具有改善加样性能的生物传感器

本申请为分案申请，原申请的申请号是 01822967.0  
5 (PCT/US01/11133)，申请日是 2001 年 4 月 6 日，发明名称为“具有改善加样性能的生物传感器”。

### 技术领域

本发明涉及具有改善的加样和测试性能的生物传感器，以及涉及  
10 这些生物传感器在液态样本中检测分析物或酶的用途，更优选地是定量测定分析物或酶的用途。尤其是，本发明提供了一种具有加样反应室的生物传感器，这促进了加样的速度和一致性，特别是通过毛细管流的小剂量加样。本发明还提供了具有倍增电路的生物传感器，这导致改善了测试浓度和精确度。进一步提供了用该生物传感器测试分析  
15 物或酶的方法。

### 背景技术

生物传感器是一种分析仪器，该仪器包括至少两个部分：负责测试物的选择性识别的固定化生物构件，和负责转换生物信号以进一步  
20 分析的恰当的传感设备。除了其它传感器以外，电化学生物传感器利用生物识别系统和电化学渗透提供了快速和及时分析的可能性，其特别适用于现场保健（point of care）行业的快速测定。这些仪器的发展来源于电子学、材料科学、电化学、生物化学、和免疫化学的多学科。电化分析技术是一种涉及来自化学反应的电流、电位、和电荷的电子  
25 学和化学之间的相互作用。有两种基本类型的电化分析测量方法，电位计量和电流计量。电位计量技术是一种没有电流的静电技术；测量通过离子选择膜建立的电位。用不同类型材料的膜材料，可以达到识别不同的离子。因此，电位计量探针证明已被广泛用于直接监测离子种类，例如钙、钾、和氟离子。在电流计量技术中，电极电位用于驱  
30 使电子传输反应。测定应答电流，应答电流与靶分析物的存在和/或浓

度相关。过去，在临床化学实验中，电位计量仪器应用更广泛。但是，随着在诊断中对电流计量系统方面研究量的增加，这一平衡状态已经被改变。电流计量生物传感器使得实验分析人员能够应用、快速、常规的检测。新一代生物传感器的发展方向集中于方法学，即对技术操作人员的

5 要求尽量少和预处理样本尽量少。

目前，大多数商业用生物传感器是电流计量传感器，其固定氧化还原酶作为识别生物构件，电极作为电化学转化器。由于丝网印刷技术（screen-printing）的支持，最近已实现大规模生产便宜和一次性使用的仪器。这些仪器的成功进展已经使电流计量可检测几种生物分子，

10 包括葡萄糖、胆固醇和各种药物。这种类型的电流计量生物传感器通常包括一块绝缘底板、两个或三个电极、一个介电层、和一个酶反应区。双电极生物传感器包括一个工作电极、一个反电极、和一个放置酶反应试剂的指定区域。当含有分析物的样本液被放入反应区时，反应即开始进行。两种物理作用，筛网扩散（mesh spread）和毛细管作用，

15 通常用于引导承载在反应区的样本分布均匀。反应完成后，试验分析物被氧化，反应产生的电子被捕获入还原的共合成物中。然后将控制的电位施加在两电极之间，激发第二轮氧化还原反应。这个电位必须充分足以在工作电极表面启动扩散受限制的电氧化，但不能充分激活不相干的化学反应。在延后一段较短的时间后，就观察到，并可

20 测量电化学氧化还原产生的电流，该电流与样本中分析物的存在和/或量有关。

在氧化作用的例子中，作为共反应物（co-reactant）的氧在氧化反应中被消耗，而产生作为共合成物（co-product）的过氧化氢。过氧化氢的生成量与分析物的浓度成比例。通过在阳极氧化可以检测到过氧化氢（例如， $>0.6\text{v}$ ， $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ），产生电信号（电流）。然而，氧化过氧化氢所需要的电位可以引起其他能氧化的化学物质的氧化，例如抗坏血酸、胆

25 红素、尿酸、和一些常用的药，例如乙胺苯酚，从而导致对被检测电流的干扰。可以用能转移来自氧化还原酶的电子的人造介体置换氧而避免这种干扰。几种介体已经被用于强化各种酶和电极之间的电子转移，包

30 括二茂铁和它的衍生物、钼络合物、四硫富瓦烯、吩嗪乙基硫酸酯（phenazine ethosulfate）、苯醌和六氰基高铁酸盐（hexacyanoferrate）。



确定血中分析物的传统方法需要预处理样本。直接检测全血样本就需要提供一种节省时间和劳力的简单方法。更重要地是，直接检测全血样本使家庭使用者可能做到及时监测。为了用电流计量生物传感器精确检测全血样本，成功检测分析物需要在电极处进行快速和同质反应。当小量血样本加入生物传感器时，干状试剂包括氧化还原酶和介体，必须立即溶解。这些溶解的试剂必须与血样本彻底混合以完成酶的反应和继续随后的电极反应。

测试生物样本的另一些常见问题，例如全血是粘稠的样本和分析的样本的量需要比较多。全血样本因其粘稠将不能充分分布在反应区域。对一些营养不良的人，刺指尖取足够的血将是个问题。已经观察了三种类型的欠血加样（或其他粘性样本）：第一种，样本只能覆盖测试条的前端；第二种，样本只能覆盖测试条的右半部分；第三种，样本只能覆盖测试条的左半部分。样本液的欠量或不均匀加样表明分析物的量较低，其造成人为和误导的结果偏低。

因此，在本技术领域存在着对提供改善的样本加样和测试性能的生物传感器和方法的要求。本发明着眼于该领域其它这种相关的需求。

### 发明简述

一方面，本发明提供了一种生物传感器，用该生物传感器可以迅速、均匀、经济地将样本液分布在指定反应区。本发明的另一个目标是提供一个与试剂极少接触的加样槽。样本液，例如血，可以通过在该加样槽上所穿的孔加入，通过加样槽弓形部分提供的外表面张力和反应室提供的拉力的促进作用，样本液可以被迅速地拉向反应区。从而可以完成样本液均匀分布，并且作为底物的分析物激发酶的反应而开始实验。仍然本发明的另一方面是以这样一种方式提供特殊的电极设计，即增加工作电极和反电极之间的扩散面而可能提高电流。这样，由于两个电极反应区相等且材料相同，电化学活性化学物扩散也就均匀。

在一个具体实施方案中，提供了一个用于液态样本的电化学分析的生物传感器，该生物传感器包括：a) 一个有第一端和第二端的绝缘底板；b) 一个电极系统，位于所述绝缘底板上，其中所述电极系统包

括一个工作电极和一个反电极，所述工作电极和反电极有导电导线将所述电极与在所述底板第一端上用于电化学测量的读出装置相连接，除了通向所述导电导线的一侧，所述工作电极的所有侧面都被所述反电极围绕，在所述工作电极和反电极之间有一个缝隙空间；c) 作为所述电极系统一部分的反应区，所述反应区至少占有所述工作电极、所述反电极、和所述工作电极与反电极之间的缝隙空间的一部分，所述缝隙空间垂直于所述导电导线，所述反应区在垂直于所述导电导线的方向上，是所述电极系统的全部横截面，所述反应区通过用介电材料构成的所述层覆盖非反应区来限定，所述反应区包含一种酶，该酶能催化涉及被分析的分析物的反应，或一种底物，该底物参与由被分析的酶催化的反应；和 d) 一个加样反应室，其中所述室的底部是 c) 中定义的所述反应区，所述室的顶部是一个至少覆盖了所述反应区的盖子，所述顶部在所述反应区上方有一个用于加样的开口，所述室的垂直于所述导电导线的两侧壁是由在 c) 中定义的所述介电材料构成的所述层构成，平行于所述导电导线的所述室的两侧面是敞开的，被留作通气孔。

在另一个具体实施方案中，提供了一种检测液态样本中分析物或酶的方法，这种方法包括：a) 在适合的情况下，在存在适宜的电子转移介体的情况下，用上述生物传感器接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，从而，液态样本的分析物，如果有的话，参与由生物传感器反应区含有的酶所催化的反应；或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及到生物传感器反应区所包括的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；和 b) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

另一方面，本发明提供了一种生物传感器，通过该生物传感器可以确保液态样本分布覆盖所有的指定反应区。该生物传感器可特别地用在测试粘性样本液的电化学传感器中，例如全血或含有大分子的样本。

在一个具体实施方案中，提供了一种用于液态样本的电化学分析的生物传感器，该生物传感器包括：a) 一个有第一端和第二端的绝缘

底板；b) 一个位于所述绝缘底板上的电极系统，其中所述电极系统包括一个工作电极、一个反电极，和两个参比电极，所述工作电极、反电极、和参比电极都有导电导线将所述电极与在所述底板第一端上的电

5 化学测量值的读出装置相连接，每一个所述参比电极，与所述工作电极、或反电极成对角位，并且所述工作电极/反电极、工作电极/参比电极、参比电极/参比电极之间有缝隙空间，所述工作电极和与所述工作电极成对角位的第一个参比电极形成第一个闭合电路，所述反电极和与所述反电极成对角位的第二个参比电极形成第二个闭合电路，所述第一个和第二个闭合电路连接形成第三个电路，这样所述第三个电

10 路只在所述第一和第二两个电路同时关闭时才关闭。

在另一个具体实施方案中，提供了一种用于在液态样本中检测分析物或酶的方法，这种方法包括：a) 提供一种上述的生物传感器，其中工作电极、反电极、和参比电极的至少一部分与这些电极之间的缝隙空间形成一个反应区，所述反应区包括一种酶，该酶催化涉及被分析的分析物的反应，或包括一种底物，该底物参与由被分析的酶催化的反应；b) 在适合的条件下，在存在适当电子转移介体的情况下，用包括酶或底物的生物传感器接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，从而，液态样本中的分析物，如果有的话，参与由生物传感器反应区含有的酶所催化的反应；或液态样本中的酶，如果有的话，催化

15 涉及到生物传感器反应区中所包括的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；和 c) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价液态样本中分析物或酶的存在或数量。

20

## 25 附图简述

图 1 是本发明的例证性生物传感器的的示意性顶视图。图 1A 描述包括电极系统的绝缘底板。图 1B 描述遮盖了非反应区和留下未覆盖区域作为反应区的介电层。图 1C 描述带有加样开口的顶部薄片。

图 2 是本发明的例证性生物传感器的的横截面视图。1 层：绝缘层；

30 2 层：电极层；3 层：介电层；4 层：覆盖薄片。

图 3 描述本发明例证性生物传感器反应室的可能的结构。3A：楔

面反应体；3B：四面反应体；3C：梯面反应体。

图 4 描述本发明的例证性生物传感器加样方式的顶视图和反向视图。4A：顶视图；4B：反向视图。

图 5 描述包括四部对角位置的电极的本发明的例证性生物传感器。

5 5A：顶视图；5B：四部电极的电路连接。

图 6 描述本发明的另一个包括四部对角位置的电极的例证性生物传感器。6A：顶视图；6B：四部电极的电路连接。

图 7 是本发明的例证性生物传感器-吸血管的示意性顶视图。图 7A 描述血的加样方向；图 7B 描述带有蓝色区和开孔的顶部薄片，7C 描述在样本加样侧另外附加两层介电材料构成的所述层。

图 8 是本发明的例证性生物传感器-吸血管的示意性顶视图。图 8A 描述包含电极系统的绝缘底板。图 8B 描述遮盖了非反应区和留下未遮盖区域作为反应区的介电层。图 8C 描述另外附加两层介电材料构成的所述层，和移走样本加样侧中部的介电材料构成的所述层。

15 图 9 是本发明的例证性生物传感器-吸血管的示意性顶视图。图 9A 描述包含电极系统的绝缘底板。图 9B 描述遮盖了非反应区和留下未遮盖区域作为反应区的介电层。

图 10 是本发明的例证性生物传感器-吸血管的示意性顶视图。图 10A 描述血加样方向。图 10B 描述带有蓝色区和开孔的顶部薄片。图 20 10C 说明另外附加两层介电材料构成的所述层和移走样本加样侧中部的介电材料构成的所述层。

## 发明详述

### A. 定义

25 除非有其它定义，本文所用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的意义同样。所有专利、申请、公开的申请、其它出版物和来自 GenBank 和其他数据库的序列，本文将其全部引用于此供参考。如果在本部分阐述的定义与本文引入供参考的申请、公开的申请、其它出版物和 GenBank 和其他数据库提供的序列 30 中阐述的定义矛盾或有其他不一致，在本部分阐述的定义优于引入此文供参考的定义。

正如本文所使用的，“一个”表示“至少一个”或“一个或多个”。

正如本文所使用的，“垂直于所述导电导线的方向”指与导电导线的方向基本上未相对或基本上非直线的方向。通常，垂直于导电导线的方向和导电导线的方向之间的角度从大约 45 度到大约 135 度。优选地，两个方向之间的角度是从大约 80 度到大约 100 度。更优选地，两个方向之间的角度是从大约 85 度到大约 95 度。最优选地，两个方向之间的角度是大约 90 度或是 90 度。

正如本文所使用的，“平行于所述导电导线的方向”指与导电导线的方向是基本上相对或直线的方向。通常，平行于导电导线的方向和导电导线的方向之间的角度是大约 0-45 度或 135-180 度。优选地，两个方向之间的角度是大约 0-10 度或 170-180 度。更优选地，两个方向之间的角度是 0-5 度或 175-180 度。最优选地，两个方向之间的角度是大约 0 或 180 度或者是 0 或 180 度。

正如本文所使用的，“催化涉及被分析的分析物的反应的酶”指这样一种酶，它与或者作为生物传感器的一部分或者于检测时添加的电子转移介体结合，通过氧化作用或还原作用直接或间接氧化或还原被分析的分析物，导致生成能被生物传感器检测的电流。优选地，该酶在其催化的氧化或还原反应中使用分析物做为直接底物。例如，如果被分析的分析物是葡萄糖，这个酶就可以是一种葡萄糖氧化酶。

正如本文所使用的，“一种参与由被分析的酶催化的反应的底物”指这样一种底物，它直接或间接地被用于由被分析的酶催化的氧化或还原作用，因而该氧化或还原反应，与或者作为生物传感器的一部分或者于检测时添加的电子转移介体结合，导致生成能被生物传感器检测的电流。优选地，在被分析的酶催化的氧化或还原反应中，该底物是作为直接的底物。例如，如果被分析的酶是葡萄糖氧化酶，这个底物就可以是葡萄糖。

正如本文所使用的，“工作电极和反电极是用基本上相同的材料制成”表示，相同或几乎相同的材料被用于工作电极和反电极两种电极，因此两电极有相同或几乎相同的电子转移特性。一般，两电极之间电子转移特性的差异小于 50%。优选地，两电极之间电子转移特性的差异小于 10%。更优选地，两电极之间电子转移特性的差异小于 1%。

最优选地，工作电极和反电极是用相同材料制成，它们的电子转移特性没有差别。

正如本文所使用的，“工作电极与反电极之间的缝隙空间保持基本上恒定”表示工作电极与反电极之间缝隙空间的差异足够小，以致  
5 当工作电极和反电极用基本上相同的材料制成和有基本上相同的表面积时，如果工作电极与反电极之间缝隙空间有差异，将不会影响电极工作的一致性。通常，工作电极与反电极之间缝隙空间的差异小于50%。优选地，缝隙空间的差异小于10%。更优选地，缝隙空间的差异小于1%。最优选地，工作电极与反电极之间缝隙空间保持为恒定值。

10 正如本文所使用的，“工作电极的表面面积和反电极的表面面积基本上相同”表示工作电极和反电极之间表面面积的差异足够小，以致当工作电极和反电极是用基本上相同的材料制成和工作电极和反电极之间缝隙空间保持基本上恒定时，如果工作电极和反电极之间表面积有差异，将不会影响电极工作的一致性。通常，工作电极和反电  
15 极之间表面面积的差异小于50%。优选地，表面面积的差异小于10%。更优选地，表面面积的差异小于1%。最优选地，工作电极的表面面积和反电极的表面面积相同。

正如本文所使用的，“临近第一端的介电材料的厚度基本上高于临近第二端的介电材料的厚度”表示，加样区（或反应区域临近加样  
20 区的那一端）和反应区域远离加样区域的那一端之间的高度差异足以促进样本液快速和均匀流动。通常，临近第一端的介电材料的厚度是临近第二端的介电材料厚度的至少1.5倍但小于5倍。优选地，临近第一端介电材料的厚度是临近第二端介电材料的厚度的大约3倍。

正如本文所使用的，“两个边角部分的介电材料的厚度基本上高于  
25 于中间部分介电材料的厚度”表示在有“T-形”反应区的生物传感器中，加样区（或反应区域临近加样区的的那一端）和反应区域远离加样区域的的那一端和临近加样区的非反应区域的两个边角部分之间的高度差异足以促进液态样本的快速且均匀流动。通常，临近加样区的非反应区域的两个边角部分的介电材料厚度是临近加样区的反应区域  
30 的中部介电材料厚度的至少1.5倍，但少于5倍。优选地，临近第一端的介电材料的厚度和临近第二端的两个边角部分的厚度是单位厚度的

大约 3 倍，临近第二端中部介电材料的厚度是单位厚度的大约 1 倍。

正如本文所使用的，“工作电极、反电极、和参比电极是用基本上相同的材料制成”表示工作电极、反电极、参比电极使用的是相同或几乎相同的材料，以致电极有相同或几乎相同的电子转移特性。通常，电极之间电子转移特性的差异小于 50%。优选地，电极之间电子转移特性的差异小于 10%。更优选地，电极之间电子转移特性的差异小于 1%。最优选地，工作电极、反电极、参比电极是用相同的材料制成，它们的电子转移特性没有差异。

正如本文所使用的，“参比电极与工作电极或反电极之间的缝隙空间保持基本上相同”表示，参比电极与工作电极或反电极之间缝隙空间的差异足够小，以致当工作电极、反电极、和参比电极用基本上相同的材料制成时，工作电极和反电极有基本上相同的表面面积，参比电极与工作电极或反电极之间缝隙空间的差异，如果有的话，将不会影响电极工作的一致性。通常，参比电极与工作电极或反电极之间缝隙空间的差异小于 50%。优选地，缝隙空间的差异小于 10%。更优选地，缝隙空间的差异小于 1%。最优选地，参比电极与工作电极或反电极之间缝隙空间保持恒定值。

正如本文所使用的，术语“评价（或被评价）”意思是，获得样本中存在的分析物或酶例如蛋白质或核酸的量或浓度的绝对值，也包括获得标志样本中分析物或酶水平的指数、比率、百分数、肉眼可见或其他有价值的指示，包括定量和定性测定。评价可以是直接的或间接的，实际上所检测的化学物质不需要是分析物或酶自身，但可以是，例如他们的衍生物或一些进一步产生的物质。

正如本文所使用的，“大分子”指这样一种分子，即不需要附着在其它分子上，就能形成一种与该大分子特定结合的抗体。

正如本文所使用的，“小分子”指这样一种分子，即不形成同聚物或不附着在大分子或佐剂上，就不能形成与小分子特定结合的抗体。优选地，小分子的分子量是大约或小于 10,000 道尔顿。更优选地，小分子的分子量是大约或小于 5,000 道尔顿。

正如本文所使用的，“维生素”指在某些生物物种中所需要的微量有机物。大多数维生素的功能是作为某些辅酶的成分。

正如本文所使用的，“脂类”指通过非极性溶剂例如三氯甲烷或醚从细胞或组织中提取的水不溶性、油状或含脂有机物。

正如本文所使用的，“受体”指这样一种分子，即它对给定的配体有亲和力。受体可以是天然或合成的分子。受体也可以在本领域被称作抗-配体。正如本文所使用的，受体和抗-配体可以交替使用。受体可以以他们的未改变状况被使用，或作为与其他物质的集合物被使用。受体可以以共价或非共价附着到结合成员（binding member）上、或与结合成员物理接触，附着到其上，或者可以通过特定结合物或衔接物直接或间接附着。受体的例子包括，但不局限于：抗体、细胞膜受体表面受体和内化受体、单克隆抗体和抗血清，有特殊抗原决定簇活性，例如在病毒、细胞、或其他物质上的抗原决定簇，药、多核苷酸、核苷酸、肽、辅因子、植物凝集素、糖、多糖、细胞、细胞膜、和细胞器。

正如本文所使用的，“抗体”包括抗体片段，例如 Fab 片段，其包括一条轻链和一条重链可变区。抗体包括多克隆和单克隆抗体。

正如本文所使用的，“营养或贮存蛋白质”指这样一种蛋白质，即其被细胞作为营养源或这种营养的贮存形式。营养或贮存蛋白质的非限制性例子包括麦醇溶蛋白、卵白蛋白、酪蛋白、和铁蛋白。

正如本文所使用的，“收缩或能动蛋白质”指赋予细胞和有机体收缩、变形、或向周围活动的能力的蛋白质。收缩或能动蛋白质非限制性例子包括肌动蛋白质、肌球蛋白、微管蛋白质和动力蛋白。

正如本文所使用的，“结构蛋白质”指这样一种蛋白质，即作为支撑性的细丝、索、薄膜给生物结构提供力度或保护。结构蛋白质的非限制性例子包括角蛋白、丝蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白和蛋白聚糖。

正如本文所使用的，“防卫蛋白质”指这样一种蛋白质，即保护有机体抵御其它物种的侵袭或保护机体不受损伤。防卫蛋白质的非限制性例子包括抗体、纤维蛋白原、凝血酶、肉毒杆菌毒素、白喉毒素、蛇毒和蓖麻毒蛋白。

正如本文所使用的，“调节蛋白”指这样一种蛋白质，即有助于调节细胞或生理活性。调节蛋白的非限制例子包括胰岛素、生长激素、促肾上腺皮质激素和阻抑物。



正如本文所使用的，“样本”指可能包含某种分析物或酶的任何物质，期望对分析物或酶进行检测。样本可以是生物样本，例如生物液体或生物组织。生物液体的例子包括尿、血、血浆、血清、唾液、精液、粪便、痰、脑脊液、泪、粘液、羊水或类似物。生物组织是细胞群，通常以独特的一类与细胞间质一起形成人、动物、植物、细菌、真菌、或病毒结构的结构物质的一种，包括结缔组织、上皮组织、肌肉组织和神经组织。生物组织的例子还包括器官、肿瘤、淋巴结、动脉和个体细胞（群）。样本也可以是包括体外制备的含有分子的靶分析物或酶的混合物。

10 正如本文所使用的，“液态样本”指样本为天然的液体或流体，例如生物液体。“液体样本”也指天然存在的非液态样本，例如，固体或气体，但是被制备成包含该固体或气体样本物质的液体、流体、溶液或混悬液。例如，液态样本可以包括含有生物组织的液体、流体、溶液或混悬液。

15 正如本文所使用的，“以组织或器官特异方式表达”意思指一种基因表达模式，以该模式基因被或者暂时地或者组成型表达，只在某些组织或器官，不是在其他组织或器官中。

正如本文所使用的，“组织”意思指类似细胞和围绕它们的胞内物质的集合。体内有四种基本的组织：1) 上皮组织；2) 结缔组织，包括血、骨、和软骨；3) 肌肉组织；和 4) 神经组织。

20 正如本文所使用的，“器官”意思指发挥特定功能的任何身体部分，例如呼吸、分泌或消化器官。

正如本文所使用的，“植物”意思指植物界的各种各样光合作用的、真核的多细胞生物体的任何一种，特征是产生胚，含叶绿体，有纤维素构成的细胞壁，不能自由运动。

25 正如本文所使用的，“动物”意思指动物界的多细胞生物体，特征是能自由运动，非光合作用的新陈代谢，对刺激有明显反应，生长受限制和固定的身体结构。动物的非限制例子包括鸟例如鸡、脊椎动物例如鱼和哺乳动物例如鼠、兔、猫、狗、猪、奶牛、牛、羊、山羊、马、猴和其他非人类的灵长类。

30 正如本文所使用的，“细菌”意思指具有非区室化环状 DNA 和大

约 70S 的核糖体的小原核细胞生物体（线尺寸为  $1\mu$ ）。细菌的蛋白质合成与真核细胞的蛋白质合成不同。很多抗细菌抗体干扰细菌蛋白质合成，但是不影响被感染的宿主。

正如本文所使用的，“真细菌类”意思指除古细菌以外的细菌的主要亚门。大多数格兰氏阳性菌、蓝细菌、支原体、肠细菌、假单胞杆菌属和叶绿体是真细菌类。真细菌类的细胞质膜含有结合有酯的脂；细胞壁上有肽聚糖（如果有细胞壁）；在真细菌类中没有发现内含子。

正如本文所使用的，“古细菌”意思指除真细菌类外的细菌的主要亚门。有三种主要的古细菌目：极端嗜盐菌、产甲烷菌和依赖硫极端嗜热菌。古细菌与真细菌类在核糖体结构、拥有（在某些情况下）内含子、和其他一些特征包括膜成分方面不同。

正如本文所使用的，“病毒”意思指活的专性胞内寄生物，但没有细胞特性，包括 DNA 或 RNA 和一个蛋白质壳。病毒的直径从大约 20-大约 300nm。I 类病毒（Baltimore 分类）有一个双链 DNA 作为它们的基因组；II 类病毒有一个单链 DNA 作为它们的基因组；III 类病毒有一个双链 RNA 作为它们的基因组；IV 类病毒有一个正单链 RNA 作为它们的基因组，基因组自身的作用为 mRNA；V 类病毒有一个负单链 RNA 作为它们的基因组，作用为 mRNA 合成的模板；VI 类病毒有一个正单链 RNA 基因组，但是不仅在复制时而且在 mRNA 合成时，具有 DNA 中间体。大多数病毒通过它们在植物、动物和原核生物中引起的疾病被识别。原核生物的病毒被称之为噬菌体。

正如本文所使用的，“真菌”指真核生物的一个分类，其无规律的群聚性生长，无根、无茎或叶，没有叶绿素或其它能进行光合作用的色素。每一个有机物（叶状体）是丝状单细胞，具有的分支的体细胞结构（菌丝），被含有葡聚糖或壳多糖或含有它们两者的细胞壁包裹，并且含有真正的细胞核。

正如本文所使用的，“疾病或病症”意思指机体处于由例如感染或遗传缺陷导致的病理状况，特征在于一些能辨别的症状。

正如本文所使用的，“感染”意思指有引发疾病潜力的生物侵害多细胞生物体的躯体。

正如本文所使用的，“感染性生物”意思指能引起多细胞机体感

染的生物。多数感染性生物是微生物，例如病毒、细菌和真菌。

正如本文所使用的，赘生物（瘤形成）指不正常的新生物，这意味着与肿瘤相同，其可以是良性或恶性。与增生不同，即使机体不存在原始刺激，赘生增殖仍然持续。

5 正如本文所使用的，癌是指由任何类型的恶性肿瘤引起的疾病的总称。

为了使公开内容清楚，本发明的详细描述分为下述部分，但不受其限制。

## 10 B. 具有加样反应室的生物传感器及其使用方法

一方面，本发明涉及一种用于液态样本电化学分析的生物传感器，该生物传感器包括：a) 一个具有第一端和第二端的绝缘底板；b) 一个位于所述绝缘底板上的电极系统，所述电极系统包括一个工作电极和一个反电极，所述工作电极和反电极有导电导线将所述电极与所述  
15 底板第一端上用于电化学检测的读出装置相连接。所述工作电极除了通向所述导电导线的一侧，所有侧面都被反电极围绕，在所述工作电极与反电极之间有一个缝隙空间；c) 反应区是所述电极系统的一部分，所述反应区至少占据所述工作电极、反电极、和所述工作电极与反电极之间缝隙空间的一部分，所述缝隙空间垂直于所述导电导线。所述  
20 反应区垂直于所述导电导线，是电极系统的一个全部横截面，由介电材料构成的所述层覆盖非反应区限定了所述反应区，所述反应区包含一种酶，其催化涉及被分析的分析物的反应，或包含一种底物，其参与被分析的酶催化的反应；d) 一个加样反应室，其中所述室的底部是c) 中限定的所述反应区。所述室的顶部是一个盖子，至少覆盖着所述  
25 反应区，所述顶部在所述反应区上方有个加样开口，所述室的与所述导电导线垂直的两侧壁由 c) 中限定的所述介电材料构成的所述层组成，所述室的平行于所述导电导线的两侧壁的至少一部分是敞开的，被留作通气孔。

生物传感器可以是任何适当的形状，例如长方形、方形、圆形、  
30 椭圆形、或其他规则或不规则的形状。优选地，生物传感器是长方形。

绝缘底板可以由任何适宜的材料制成。优选地，绝缘底板包括乙

烯基聚合物、聚酰亚胺 (polyimide)、聚酯、尼龙、硝化纤维或它们的组合。

工作电极和反电极可以由任何适当的材料制成。虽然不要求，但是在反应区内，工作电极和反电极优选地由基本上相同的材料制成。

5 更优选地，在反应区内工作电极和反电极由相同的材料制成。最优选地，在整个生物传感器内工作电极和反电极是由相同的材料制成。

工作电极与反电极之间的缝隙空间可以保持不变或可以变化。优选地，工作电极与反电极之间的缝隙空间在反应区内基本上保持不变。

更优选地，工作电极与反电极之间的缝隙空间在反应区内保持不变。

10 最优选地，工作电极与反电极之间的缝隙空间在整个生物传感器内保持不变。

在反应区内，工作电极的宽度和反电极的宽度可以相同或不同。在一个优选的实施方案中，反应区内工作电极的宽度是反电极宽度的大约两倍。

15 工作电极的表面面积可以与反电极的表面面积相同或不同。优选地，工作电极的表面面积与反电极的表面面积在反应区内基本上相同。更优选地，工作电极的表面面积与反电极的表面面积在反应区内相同，最优选地，工作电极的表面面积与反电极的表面面积在整个生物传感器内是相同的。

20 一个优选的实施方案中，在反应区内工作电极和反电极是由相同的材料制成，工作电极与反电极之间缝隙空间在反应区内保持相同，工作电极的表面面积与反电极的表面面积在反应区内相同。

通过该领域已知的任何适宜方法，可以将电极系统安装或配置在绝缘底板上。例如，电极可以从卷轴展开和用热溶性粘合剂粘合在绝缘底板上。25 优选地，电极系统被丝网印刷 (screen-printed) 在绝缘底板上。当电极系统丝网印刷在绝缘底板上时，工作电极和反电极可以含有炭膏，导电导线可以含有导电银膏。也可以通过下列文献中公开的方法将电极系统安装或配置在绝缘底板上：Kureishi 等人，Bioelectrochem. Bioenerg. (生物电化学生物能学), 48(1):95-100(1999); 30 Anzai 等人，Anal. Chem.(分析化学), 70 (4) : 811-7 (1998) ; 和 Stonehuerner 等人，Biosens. Bioelectron(生物传感器, 生物电子), 7(6):

421-8 (1992)。

可以通过用介电材料构成的所述层覆盖非反应区来限定反应区。可以使用任何适宜的介电材料。优选地，用在生物传感器上的介电材料是乙烯基聚酯、聚酰亚胺或它们的组合。

- 5 为了确保样本液，特别是小量的样本液快速且均匀地分布，临近第一端的介电材料的厚度基本上高于临近第二端的介电材料的厚度。优选地，临近第一端的介电材料的厚度大约是临近第二端的介电材料厚度的大约三倍。

10 加样反应室的顶部必须覆盖至少整个反应区。优选地，生物传感器有一个盖子，它覆盖整个生物传感器的表面，加样反应室顶部是整个生物传感器盖的相应部分。在一个实例中，整个生物传感器的盖子是一个粘附在非反应区上的薄片，顶部开口是在薄片上钻开的孔。优选地，薄片的钻孔有一个伸出到反应区的弓形加样槽部分，形成一个凸面，所述凸面作为样本液进入反应区的通道，凸面的弓部有助于促进样本液快速吸入。

15 虽然不要求，但绝缘底板可以是透明的，从而样本液被引入到透明绝缘底板的反面上，通过透明绝缘底板就可以监测液态样本的运动。

生物传感器还可以在反应区含有电子转移介体。例证性的转移介体包括二茂铁和它的衍生物、钼络合物、四硫富瓦烯、吩嗪乙基硫酸酯、苯醌和六氰高铁酸盐。

20 生物传感器可以有一个“T-形”反应区，其中临近第二端的非反应区被分成两个边角部分和一个中间部分，或者通过不用介电材料构成的所述层覆盖中部，或者通过使两个边角部分介电材料的厚度基本上高于中部介电材料的厚度，中间部分构成反应区的一部分，由此反应区占据一个 T 形区域，其包括与所述导电导线垂直的全部横截面，  
25 和一个与所述导电导线平行的条状区域，该区域从横截面到第二端边缘。优选地，临近第一端的介电材料的厚度和临近第二端的两个边角部分的厚度是单位厚度的大约 3 倍，临近第二端的中部介电材料的厚度是单位厚度的大约 1 倍。

30 另一方面，本发明涉及一种检验液态样本中分析物或酶的方法，该方法包括：a) 在适合的条件下，在存在适当电子转移介体的情况下，

用含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本接触上述生物传感器，从而，样本液中的分析物，如果有的话，参与由生物传感器反应区含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区所包括的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；b) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

本发明方法可以检测适量的任何液态样本。优选地，本发明方法用于检测小量液态样本。例如，将被检测的液态样本量从大约 1.5 微升到大约 10.0 微升。优选地，将被检测的液态样本的量从大约 1.5 微升到大约 3.0 微升。

本发明方法可以检测任何涉及氧化或还原反应的分析物或任何催化氧化或还原反应的酶。例如，将被检测的分析物可以是葡萄糖。优选地，生物传感器反应区所包括的酶是葡萄糖氧化酶，在检测中所用的电子转移介体是铁氰化物。

在一个具体实施方案中，本发明涉及一种检测液态样本中分析物或酶的方法，该方法包括：a) 在适合条件下，用在反应区带有适当电子转移介体的上述生物传感器，接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，从而，样本液中的分析物，如果有的话，参与生物传感器反应区所含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区所包括的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与生物传感器反应区的电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；b) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

在另一个具体实施方案中，本发明涉及一种检测液态样本中分析物或酶的方法，该方法包括：a) 在适合条件下，用带有适宜电子转移介体的上述有“T形”反应区的生物传感器接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，从而，样本液中的分析物，如果有的话，参与生物传感器反应区所含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区所包括的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；b) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析

物或酶的存在或数量。

### C. 带有四部对角位电极的生物传感器及其使用方法

一方面，本发明涉及一种用于液态样本电化学分析的生物传感器，  
5 这种生物传感器包括：a) 一个有第一端和第二端的绝缘底板；b) 一个位于所述绝缘底板上的电极系统，其中所述电极系统包括一个工作电极、一个反电极、和两个参比电极，所述工作电极、反电极、和参比电极有导电导线将所述电极与所述底板第一端上用于电化学测量的读出装置相连接，所述每一个参比电极与所述工作电极或反电极成对  
10 角位，并且所述工作电极/反电极、工作电极/参比电极、和参比电极/参比电极之间有缝隙空间，所述工作电极和与所述工作电极成对角位的第一个参比电极形成第一个闭合电路，所述反电极和与所述反电极成对角位的第二个参比电极形成第二个闭合电路，所述第一个和第二个闭合电路连接形成第三个电路，只是当所述第一和第二个电路同时  
15 封闭时，所述第三个电路才闭合。

生物传感器可以是适当的任何形状，例如长方形、方形、圆形、椭圆形或其他规则或不规则的形状。优选地，生物传感器是长方形。

绝缘底板可以用任何适宜的材料制作。优选地，绝缘底板包括乙  
20 烯基聚合物、聚酰亚胺 (polyimide)、聚酯、尼龙、硝化纤维素或它们的组合。

工作电极、反电极和参比电极可以是任何适当的材料制成，虽然不要求，但是在反应区内，工作电极、反电极和参比电极优选地由基本上相同的材料制成。更优选地，在反应区内工作电极、反电极和参  
25 比电极由相同的材料制成。最优选地，在整个生物传感器内工作电极、反电极和参比电极由相同的材料制成。

参比电极与工作电极或反电极之间的缝隙空间可以保持不变或可以变化。优选地，参比电极与工作电极或反电极之间的缝隙空间在反应区内保持基本上不变。更优选地，参比电极与工作电极或反电极之间的缝隙空间在反应区内保持不变。最优选地，参比电极与工作电极  
30 或反电极之间的缝隙空间在整个生物传感器内保持不变。

工作电极的表面面积与反电极的表面面积可以相同或不同。优选

地，在反应区内工作电极的表面面积与反电极的表面面积基本上相同。更优选地，在反应区内工作电极的表面面积与反电极的表面面积相同。最优选地，在整个生物传感器内工作电极的表面面积与反电极的表面面积都相同。

- 5        在一个优选的实施方案中，在反应区内工作电极、反电极和参比电极由相同的材料制成，参比电极与工作电极或反电极之间的缝隙空间在反应区内保持一致，工作电极的表面面积与反电极的表面面积在反应区内一致。

通过该领域已知的任何适宜方法，可以将电极系统安装或配置在  
10 绝缘底板上。例如，电极可以从卷轴展开和用热溶性粘合剂粘合在绝缘底板上。优选地，电极系统被丝网印刷（screen-printed）在绝缘底板上。当电极系统丝网印刷在绝缘底板上，工作电极、反电极和参比电极可以含有炭膏，导电导线可以含有导电银膏。也可以通过在下列文献中所公开的方法把电极系统安装或配置在绝缘底板上：Kureishi 等人，*Bioelectrochem. Bioenerg.*(生物电化学生物能学)，48（1）：95-100  
15 （1999）；Anzai 等人，*Anal. Chem.*(分析化学)，70（4）：811-7（1998）；和 Stonehuerner 等人，*Biosens. Bioelectron.*(生物传感器，生物电子)，7（6）：421-8（1992）。

工作电极、反电极和参比电极可以以任何适宜的样式排列。优选  
20 地，除了通向导电导线的一侧，参比电极的所有侧面被工作电极和反电极包围。而且优选地，参比电极被分开尽可能远的距离，既不与工作电极也不与反电极接触。可选择地，可以如图 6 所描述的那样，参比电极在外面，工作电极和反电极在里面。

生物传感器可以进一步包括反应区，其中工作电极、反电极、和  
25 参比电极的至少一部分与这些电极之间的缝隙空间形成反应区，所述反应区包括催化涉及被分析的分析物的反应的酶，或参与由被分析的酶所催化的反应的底物。

生物传感器可以进一步在反应区内包括电子转移介体。例证性转移介体包括二茂铁和它的衍生物、钌络合物、四硫富瓦烯、吩嗪乙基  
30 硫酸酯、苯醌和六氰高铁酸盐。

生物传感器可以进一步包括加样反应室，其中反应区垂直于导电



导线，是电极系统的全部横截面，反应区通过用介电材料构成的所述层覆盖非反应区来限定，生物传感器还包括加样反应室，其中所述室的底部是反应区，所述室的顶部是一个盖子，它至少覆盖反应区，在反应区上面的所述顶部有一个加样开口，所述室的与所述导电导线垂直的两侧壁由介电材料构成的所述层组成，所述室的平行于所述导电导线的两侧壁的至少一部分是敞开的，被留作通气孔。

反应区可以通过用介电材料构成的所述层覆盖非反应区限制。任何适宜的介电材料都可以使用。优选地，在生物传感器中所用的绝缘材料是乙烯基聚酯、聚酰亚胺或它们的组合。

10 为了确保样本液，特别是小量的样本液快速且均匀地分布，临近第一端的介电材料的厚度基本上高于临近第二端的介电材料的厚度。优选地，临近第一端的介电材料的厚度大约是临近第二端的介电材料厚度的大约三倍。

加样反应室顶部必须至少覆盖整个反应区。优选地，生物传感器有一个盖子，它覆盖整个生物传感器的表面，加样反应室顶部是整个生物传感器盖子的相应部分。在一个实例中，整个生物传感器的盖子是一个粘附在非反应区上的薄片，顶部开口是在所述薄片上钻开的孔。优选地，薄片的钻孔有一个伸出到反应区的弓形加样槽部分，从而形成一个凸面，所述凸面作为样本液进入反应区的通道，凸面的弓部协助促进样本液快速吸入。

20 虽然不要求，但绝缘底板可以是透明的，由此液态样本被引入到透明绝缘底板的反面上，通过透明绝缘底板就可以监测液态样本的运动。

生物传感器可以有一个“T-形”反应区，其中临近第二端的非反应区被分成两个边角部分和一个中间部分，通过如下方式使中间部分构成反应区的一部分，即或者通过不用介电材料构成的所述层覆盖中部，或者通过使两个边角部分的介电材料厚度基本上高于中部介电材料的厚度，由此反应区占据一个 T 形区域，该区域包括与所述导电导线垂直的全部横截面，和一个与所述导电导线平行的条状区域，该区域从横截面到第二端边缘。优选地，临近第一端的介电材料的厚度和临近第二端的两个边角部分的厚度是单位厚度的大约 3 倍，临近第二

端的中部介电材料的厚度是单位厚度的大约 1 倍。

在另一个具体实施方案中，提供了一种在液态样本中检测分析物和酶的方法，该方法包括：a) 提供上述生物传感器，其中工作电极、反电极、和参比电极的至少一部分与这些电极之间的缝隙空间形成一个反应区，所述反应区包括一种酶，其催化的反应涉及被分析的分析物，或包括一种底物，其参与由被分析的酶催化的反应；b) 在适合的条件下，用带有适宜电子转移介体，包括酶或底物的生物传感器，接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，由此样本液中的分析物，如果有的话，参与由生物传感器反应区所含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区所包括的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；c) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

本方法可以检测适量的任何液态样本。优选地，本方法用于检测小量液态样本。例如，将被检测的液态样本的量从大约 1.5 微升到大约 10.0 微升。优选地，将被检测的液态样本的量从大约 1.5 微升到大约 3.0 微升。

本方法可以检测任何涉及氧化或还原反应的分析物或任何催化氧化或还原反应的酶。例如，将被检测的分析物可以是葡萄糖。优选地，生物传感器反应区中所含有的酶是葡萄糖氧化酶，在检测中所用的电子转移介体是铁氰化物。

在一个具体实施方案中，本发明涉及一个检测液态样本中分析物或酶的方法，该方法包括：a) 在适合的条件下，用在反应区带有适宜电子转移介体的上述的生物传感器，接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，由此样本液中的分析物，如果有的话，参与由生物传感器反应区含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区中所包括的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与生物传感器反应区携带的电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；b) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

在另一个具体实施方案中，本发明涉及一个检测液态样本中分析

物或酶的方法，该方法包括：a) 在适合的情况下，用带有适宜电子转移介体，配有加样反应室的上述生物传感器，接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，由此，样本液中的分析物，如果有的话，参与由生物传感器反应区含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区所包括的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与生物传感器反应区携带的电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；b) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

10 仍然在另一个具体实施方案中，本发明涉及一个检测液态样本中分析物或酶的方法，该方法包括：a) 在适合的情况下，用带有适宜电子转移介体，配有“T形”加样反应室的上述生物传感器，接触含有或怀疑含有分析物或酶的液态样本，从而，样本液中的分析物，如果有的话，参与由生物传感器反应区含有的酶催化的反应，或样本液中的酶，如果有的话，催化涉及生物传感器反应区的底物的反应，所述涉及分析物或底物的反应，与生物传感器反应区携带的电子转移介体结合，导致产生能被生物传感器检测到的电流；b) 检测 a) 步骤中生成的电流，由此评价样本液中分析物或酶的存在或数量。

#### D.生物传感器的例证性用途及其检测方法

20 本发明的生物传感器和方法可用于任何分析物或酶的定性或定量检测。例如，被检测的分析物可以是高分子如肽、蛋白质，例如，抗体或受体，寡核苷酸、核酸、维生素、寡糖、碳水化合物、脂类，或小分子，或它们的络合物。例证性的蛋白质或肽包括酶，转运蛋白如离子通道和泵蛋白、营养蛋白或贮存蛋白，收缩蛋白或能动蛋白如肌动蛋白和肌球蛋白，结构蛋白，防卫蛋白或调节蛋白如抗体、激素、和生长因子。例证性的核酸包括 DNA（脱氧核糖核酸）例如 A-型、B-型、Z-型 DNA、和 RNA（核糖核酸）例如 mRNA、tRNA、rRNA。核酸可以是单链、双链、和三链核酸。例证性的维生素包括水溶性维生素例如硫胺素、核黄素、烟酸、泛酸、吡哆醇、生物素、叶酸、维生素 B<sub>12</sub> 和抗坏血酸，和脂溶性维生素例如维生素 A、维生素 D、维生素 E、和维生素 K。例证性的脂类包括三酰基甘油如三硬脂酸甘油酯、

三棕榈酸甘油酯和三油精甘油酯，蜡、磷酸甘油酯如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、和心磷脂，鞘脂类如鞘磷脂、脑苷脂类和神经节苷脂，固醇类如胆固醇和豆甾醇和固醇脂肪酸脂。脂肪酸可以是饱和脂肪酸如月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、和二十四酸，或不饱和脂肪酸如棕榈油酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸。

更优选地，被检测的分析物或酶是生物途径的标记物，细胞周期的一个阶段、细胞类型、组织类型、器官类型、发育阶段、疾病、病症或感染类型或阶段、或药物或其他治疗。例证性的生物组织包括结缔组织、上皮组织、肌肉或神经组织。例证性的器官包括眼的辅助器官、环旋器(annulospiral organ)、听觉器官、契维茨氏 (Chievitz) 器官、室周器、柯替氏 (Corti) 器、关键器官、釉器、终器、女性外生殖器官、男性外生殖器官、飘浮器官、鲁菲尼氏雾化器(flower-spray organ of Ruffini)、生殖器、高尔基肌腱器、味器、听觉器官、女性内生殖器、男性内生殖器、插入器、犁鼻器、神经血器官、神经腱器官、嗅觉器、耳石器、下垂器(ptotic organ)、罗氏 (Rosenmüller) 器、感觉器官、嗅觉器官、螺旋器、连合下器、穹窿下器、超常器、触觉器、靶器官、味觉器、触器、泌尿器官、终板血管器、前庭器官、前庭蜗器、退化器官、视力器官、视觉器官、犁鼻器、游走器官、可操纵的韦伯 (Weber) 器官和主动脉旁体 (organ of Zuckerkandl)。例证性的动物内脏器官包括脑、肺、肝脏、脾脏、骨髓、胸腺、心脏、淋巴、血液、骨、软骨、胰腺、肾脏、胆囊、胃、肠、睾丸、卵巢、子宫、直肠、神经系统、腺体、内血管。例证性的疾病或病症包括肿瘤 (新生物)、癌、免疫系统疾病或病症、代谢性疾病或病症、肌肉和骨骼疾病或病症、神经系统疾病或病症、信号疾病或病症、转运蛋白疾病或病症。

本方法可以检测任何液态样本分析物。例证性的液态样本包括缓冲剂、血、血清、血浆、或尿、或含有固体或气体生物物质的溶液或悬浮液。

## 30 E. 优选的实施方案

### 1. 带有加样反应室的例证性生物传感器

在一个具体实施方案中，本发明提供了一种生物传感器，其包括一个电绝缘底板，包括一个工作电极和一个反电极的两个丝网印刷电极，至少包括氧化还原酶、电子转移介体的反应层，和一个反应室。工作电极居于反应区的中心，被反电极以均匀的短距离围绕。应用在这个工作电极的脉冲电压激活还原介体的电子氧化，所得到的电子流  
5 5 转换为可测量的电流信号。

为了完成均匀且快速的反应，用两个装置来促进样本加样：一个“加样凸面”和一个“梯面反应体”。梯面反应体的两个平行面是这样构成的，即薄的介电材料构成的所述层从反应区外侧绕过（到样本加样区），3倍厚度的同样介电材料构成的所述层从反应区内侧绕过（到电极引线）。顶部主要表面通过用薄片覆盖所述室构成。除反应区上  
10 10 面的长方形部分之外，薄片的两端有粘合剂材料。反应室横向侧上的两个梯形留有通气口。覆盖薄片上的憩室形成加样槽。

通过触摸加样槽，样本液加样被轻易完成。加样槽伸向反应室的弓部形成面向反应区的凸面。这被称作“加样凸面”，目的是通过外向表面张力提供辅助推进作用。向上的薄片和侧面的两个梯形通气孔对样本液形成向上拉力。用这个特殊设置，测试只需要非常小量的样本，例如，1.5微升。将样本液如血快速吸取到反应区确保样本液在反应层上形成均匀薄层，这样确保了迅速和均一的酶反应，及随后均匀  
20 20 产生电流。

本发明的另一方面是加样槽可以设置在传感器的底部。在顶面，传感器的前部分做成透明的，以用作样本液的定位窗口，例如，在指  
25 25 端穿刺，和用作监测液体流动的窗口。通过底侧的槽引入样本非常容易，引入的量可以确保覆盖整个反应层。这个设计还有另一个益处，即能选择取样点，例如在除了指尖以外的身体其它部分穿刺。前臂神经较少，可以作为疼痛较少的取血选择点。本发明的这一独特设计已经显示了可以便利地从前臂取血。

已经发现在从指尖取血的传统方法中，穿刺的指端必须正好放置在加样槽顶部以让血滴滴入槽内。这通常阻碍了槽的可视性，因此常常妨碍成功地取血样。用这种方法对贫血人甚至更不利地使用了他们欠缺的  
30 30 血。仍然在本发明的另一方面，样本液可以通过生物传感器底部被引入。

如图 4 所示, 样本通过位于生物传感器底部的加样槽引入。在顶侧条的前部留有一个透明窗口, 可以做到在指端选择较好的穿刺点和清楚观察样本的运动。

在上面提到的生物传感器中, 反应层实际上包括含有氧化还原酶、电子转移介体的试剂混合物, 和一个电极系统。样本液被加入槽内, 在加样凸面和梯形反应体的帮助下被立即吸入反应区。在非常短的时间内, 试剂分解, 酶反应开始进行。在酶反应完成时, 在电极之间运用受控电压激发了另一轮电子氧化。在短时间的滞延后, 测量还原介体的电子氧化作用产生的电流, 该电流涉及样本液中分析物的存在或量。

作为本发明生物传感器的一个实例, 下文将描述一种葡萄糖传感器。图 1 是本发明的生物传感器的丝网印刷电极系统的示意性顶视图。电极系统是通过丝网印刷两条作为传导导线的银膏和随后丝网印刷两条导电炭膏而制备。导电银膏 AB 和炭膏 BC 形成反电极, 银膏 DE 和炭膏 EF 形成工作电极。反应区周围的工作电极与反电极之间的扩散间隙是均匀的, 为 0.5mm 微米, 除了导向传导导线的一侧, 反电极包围了工作电极的所有侧面。这种布局有助于发挥电极最大功能。然后除了电表接触导线和反应区 HI, 介电材料覆盖了电极 (GH 和 IJ 区)。在电极上的反应区面积限制为  $10\text{mm}^2 (=5\text{mm} \times 2\text{mm})$ 。在反应区内, 工作电极的表面积为  $4\text{mm}^2 (=2\text{mm} \times 2\text{mm})$ , 这相当于两个反电极 ( $=2 \times 1\text{mm} \times 2\text{mm}$ ) 之和。反应区中的两电极是用相同的导电材料制成 (本例中是炭膏)。第 3 层是具有两个粘合端和一个作为加样槽的钻孔的覆盖薄片。当薄片放置在介电层上时, 形成梯形室。条状区域外侧面上的两梯面是对环境空气敞开的, 用作气孔。

图 2 所示为本发明的除试剂之外的生物传感器实施方案的横截面视图。层 1 是厚度为 0.5mm 的绝缘底板基片。该绝缘层可以是任何可用的厚度和任何材料, 只要它符合大规模生产和使用者方便的严格要求。层 2 是前面段落中所述的电极层。介电层 3 被丝网印刷在绝缘底板上。可提供电学和结构特性的任何有用的绝缘材料, 例如乙烯基聚合物和聚酰亚胺, 将适宜用作介电材料。这个介电覆盖层的其它特性是他们的两个涂层的厚度不对称, 反应侧的厚度 (90-150 微米) 是加样侧厚度 (30-50 微米) 的 3 倍。然后将具有两个粘性端的一层薄片 (层 4) 放置在介电层

的上面，形成一个作为反应室的梯形体。加样槽是薄片上的一个钻孔。

本发明生物传感器的两个重要特征是梯形反应体和加样凸面，如图3中第三个附图所示。薄片的厚度为2毫米，加样槽为一个能作为储存样本液的下凹处。该槽的弓形部分重叠且伸入到反应区中，形成面向凸面的反应层。由于外向表面张力，该加样凸面提供了辅助推进作用将样本引入。由于只有这个弓形部分没有封闭，它也可以作为样本加样的唯一通道。这样加样的样本液就只能单侧通过弓形通道，不会有样本浪费在非反应区。当加样的样本液通过加样凸面时，它们被向上向前拉，以流畅的填满反应层。拉力来之于液体和覆盖薄片的粘合和液体自身的内聚力。梯形侧面提供了拉力作用所需的气孔。

这个实施方案的优势在两方面。第一，检验所需的样本量极小，例如，1.5微升。第二，血液被快速且有效地吸入到反应区，产生同质的酶反应和依赖均匀扩散的电化学反应。

因此设计了一个实验来测试“加样凸面”和“梯形反应体”将样本引入反应层的效率。当液态样本被成功地引入到生物传感器的反应区时，葡萄糖测量计能检测化学反应导致的电流变化，进行开始实验。根据葡萄糖测量计，例如 Apex Biotechnology Co. (Apex 生物技术公司(台湾)) 的 GlucoSure，通过电子信号声显示检测到初始化学反应可以表明样本成功引入。这样可以用电子信号声发生的延迟来测量“剂量延迟”，这是样本引入的延迟。图3所示的3种不同类型的样本引入器已经被检测；仪器1是没有侧面气孔和加样凸面的反应室(图1)，仪器2是具有两个作为气孔的长方形侧面的四面反应体(图2)，仪器3是一个梯形反应体(图3)。结果如下面表1所示。作为样本液引入延迟的剂量延迟，既在四面反应体，也在没有气孔和加样凸面的反应室中已经被证实。每一设计采用10个样本(N=10)，设计1的剂量延迟出现的频率是100%，设计2是40%，梯形反应体没有发现这种剂量延迟。

表1. 三种样本引入器的剂量延迟结果

剂量延迟(秒)	仪器1	仪器2	仪器3
1	11.65	11.65	0
2	12.08	12.08	0
3	28.55	28.55	0

4	6.13	6.13	0
5	0	0	0
6	6.56	6.56	0
7	0	0	0
8	48.47	48.47	0
9	66.61	66.61	0
10	62.23	62.23	0

在使用覆盖之前，使用了薄片，在制备缓冲液中准备包括作为氧化还原酶的葡萄糖氧化酶（下文被称作 GOD）和作为电子转移介体的铁氰化钾， $K_3Fe(CN)_6$  反应化学制品。该制备缓冲液是用 0.1% Triton X-100 为表面活化剂的 0.4M 的磷酸盐缓冲液（pH=7.0）。将 3 微升的试剂分布在反应层，在放入干燥箱进一步干燥之前，以 45% 的湿度空气干燥 30 分钟。结果，形成均匀的反应层。引入样本液开始实验，通过电氧化作用产生的电流检测葡萄糖浓度。

图 7-10 中描述了制备本发明生物传感器的另一种方法。如图 7-10 所示，替换在样本加样侧制备一层（例如，厚度大约为 0.25mm）介电材料构成的所述层，而可以如图 7-10 所示在这个区域丝网印刷两层以上（例如，厚度为 0.25x2）介电材料以留出沟槽样或“T-形”样本移动通道。因为上述反应区被印制的介电材料限定为长方形，从而试剂受到了限制，在加样时不会溢出。有钻孔和特殊设计的蓝区的顶部薄片随后被放置在上

15 面所述的电极板上。从而位于上述电极板上的憩室就制备出生物传感器。在这个特殊设计的生物传感器中，样本液的转移途径是 T 型沟槽，两个通气孔开在 T 型沟槽竖柄的两端。在加样槽的前部，一个连接到 T 型沟槽垂直柄的凸面作为加样区。这使得样本液快速且均匀地加样成为可能。这也使生物传感器制作过程变得简单。

20 虽然前面描述的都是有关葡萄糖电流计量生物传感器，但本发明广泛应用于酶相关系统，例如胆固醇传感器，酒精传感器、乳酸传感器，等等。如上所述，本发明的生物传感器能快速测量各种样本的特定成分。而且，本发明的制作过程使得可以用相当简单的步骤、低成本地大规模生产生物传感器带。



## 2. 带有四部对角位电极的例证性生物传感器

本发明也公开了具有四部电极的生物传感器：一部工作电极、一部反电极、和两部参比电极，优选地丝网印刷在绝缘底物上。工作电极和反电极可以具有相同的大小，且用同样的材料制备。它们彼此之间的间隔为一段均匀的短距离，这样可以保证化学和电子转移的均匀扩散。能催化分析物的酶可以添加在上面提到的电极上。也可以在该区域添加用于电化学反应的电子陷阱。含有分析物的样本液从电极条的前端加入，酶和电化学反应后能测量到在工作电极产生的电流，该电流与分析物的存在或浓度有关。

两个参比电极居于样本转移路径的下游。它们具有同样大小，且用相同的材料制成。这两个电极被分开最远，既没有与工作电极也没有与反电极接触。按照这样一种安排，所提及的电极中的一个居于工作电极的下游，另一个参比电极居于反电极的下游。临近工作电极的参比电极与反电极形成一个闭合电路，而临近反电极的参比电极与工作电极形成闭合电路。这两个闭合电路然后形成另一个闭合电路。当含有检测分析物的样本液从前端加入电极条，它必须很好分布盖住所有反应区以便激发用于电化学反应的激发电位。为了样本液分布于良好状态，本发明的电极条核查三方面：样本转移过程，反电极侧面的覆盖和工作电极侧面的覆盖。样本液的阻抗必须能封闭所有三条电路。用有一个输入端连接激发电位的操作扩大器耦合电路。

本发明的生物传感器可以防止由于样本液量不足或分布不均而得到不正确的分析结果。建立完整的电路要求样本液充分地分布，以覆盖工作电极、反电极、和居于这两个所提及电极下游的参比电极。此外，覆盖部分反应区的样本液非均匀分布就不能建立完整的电路。来之反电极侧的样本液必须覆盖工作电极侧的远端以能够建立电路，反之亦然。用这三点对照，这个覆盖的电极带就不会受到不易扩散的样本如全血或大分子样本的干扰。

图 5 所示为本发明的这个例证性生物传感器的优选的丝网印刷电极系统。工作电极和反电极是首先通过丝网印刷作为导电线线的两个银膏 5 和 6，随后将两个导电炭膏 1 和 4 丝网印刷在绝缘底物上而制备。两个参比电极 2 和 3 是通过在绝缘底物上丝网印刷两个银膏/氯化银膏形成。绝

缘底物可以是任何有用的绝缘材料，例如能提供电子和结构特性的乙烯基聚合物、聚酯和聚酰亚胺。工作电极和反电极之间扩散间隙在反应区各处是均匀的。这些电极的计量端用于接触仪器，参比电极的电极端被排列使得两个前端 9 和 10 彼此的间隔分开最远，不接触反电极和工作电极。它们居于样本到工作电极和反电极的转移路径的下游。工作电极 1 的接触柄与居于反电极下游的参比电极 3 的接触柄形成电路。反电极 4 的接触柄与居于工作电极下游的参比电极的接触柄形成另一个电路。这两个电路然后连接形成另一个与微处理机连接的电路。只有当两个电路同时关闭时，整个电路才关闭。这个电路与一个其输入端与激发电势连接的运算放大器连接。当样本液加入后阻抗使得两个小电路的开关关闭时，整个电路被关闭，停止了激发电势的产生。在酶反应完成后，激发电势再一次产生，开始了电化学反应。然后测量从电化学反应产生的电流，该电流与分析物的存在或浓度相关。

电极条的反应区是通过用介电材料在除了设计区域和接触柄的区域覆盖电极形成。电极上的反应面积限制为  $15\text{mm}^2(=5\text{mm} \times 3\text{mm})$ 。在反应区内，工作电极的表面面积是  $4\text{mm}^2(=2\text{mm} \times 2\text{mm})$ ，这相当于反电极的表面面积。反应区的两个电极是用相同的导电材料制成（在这个例子中是炭膏）。图 6 描述了带有四部对角位电极的相似生物传感器。

虽然前面描述的都与葡萄糖电子计量生物传感器有关。但本发明广泛应用于酶相关系统例如胆固醇传感器、酒精传感器、乳酸传感器，等等。如上所述，本发明的生物传感器能快速地测量各种样本中的特殊成分。

上述的所有实施例只是为了描述目的，不是为了限制本发明的范围。可以对上面的那些描述做出许多变化。由于对上述实施例的修改和变化对本领域普通技术人员将会是明显的，因此本发明只受所附权力要求范围的限制。

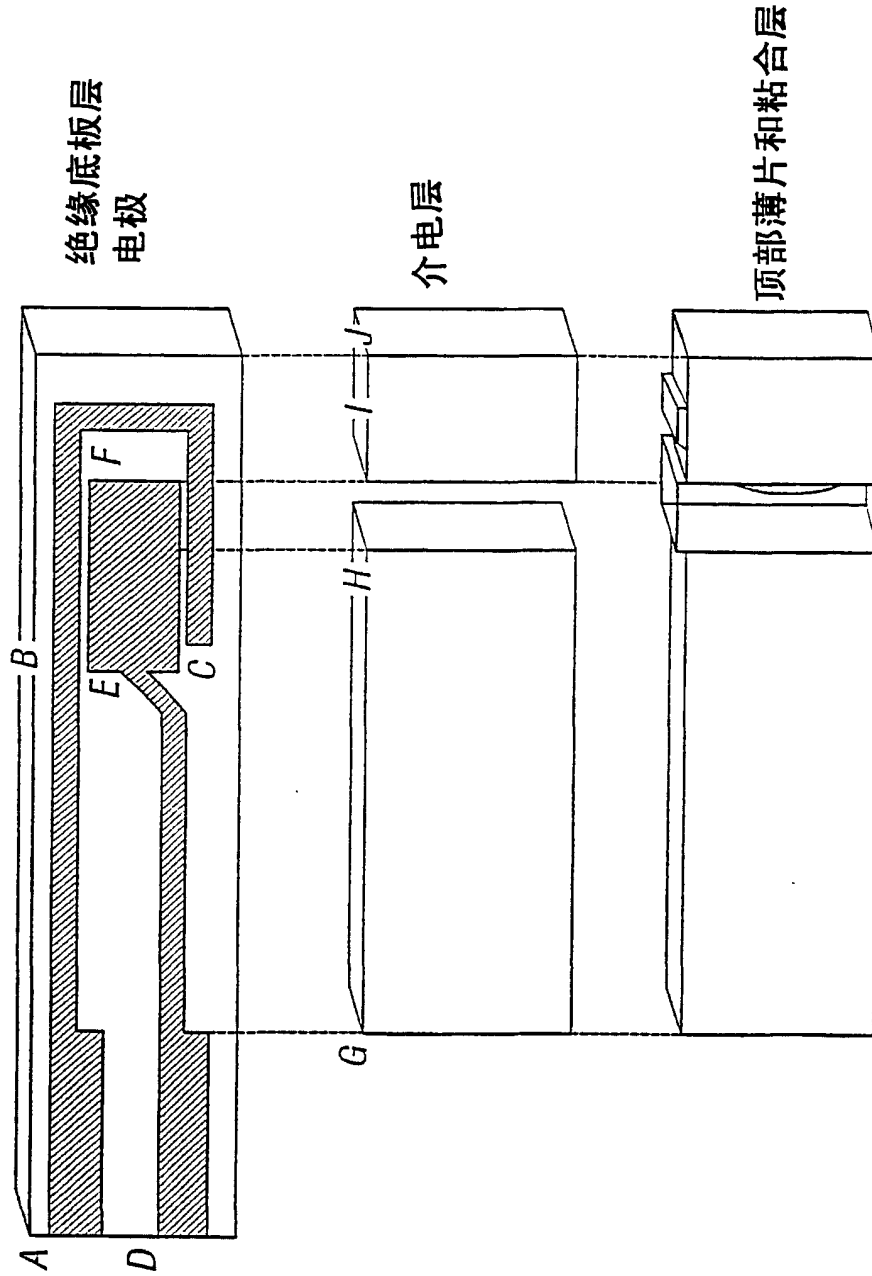
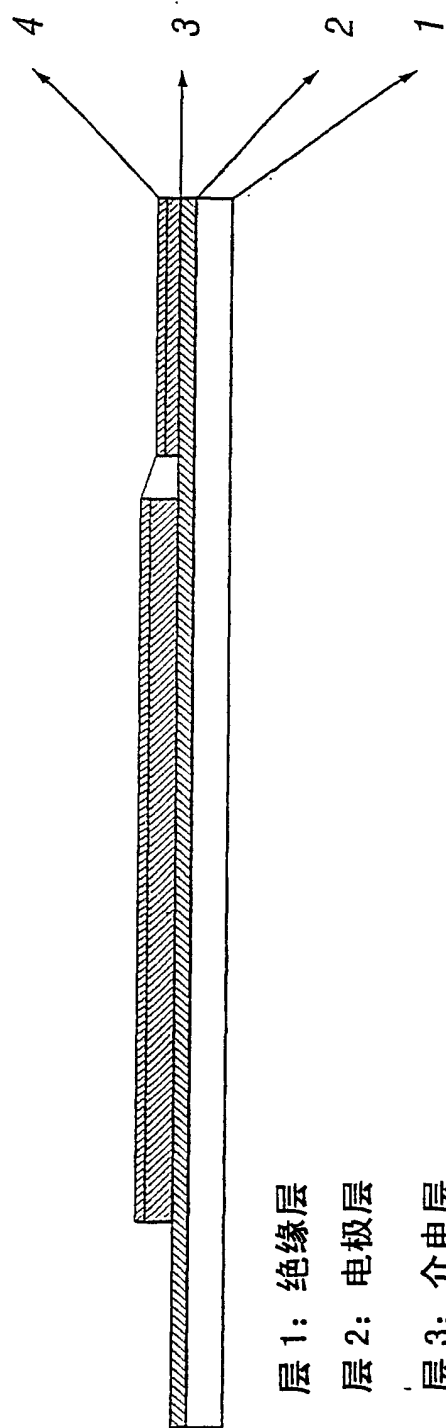


图 1A

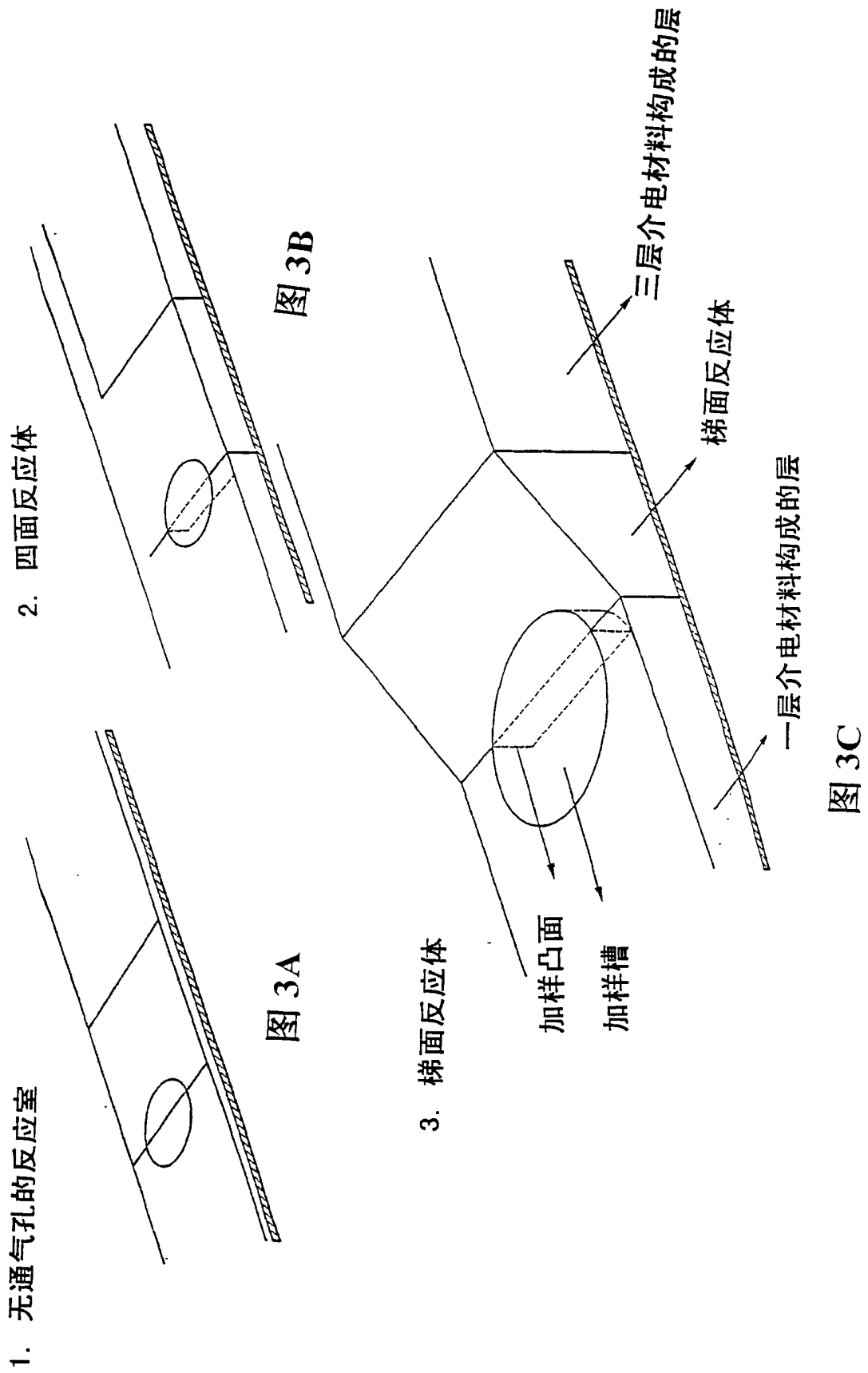
图 1B

图 1C



- 层 1: 绝缘层
- 层 2: 电极层
- 层 3: 介电层
- 层 4: 覆盖薄片

图 2



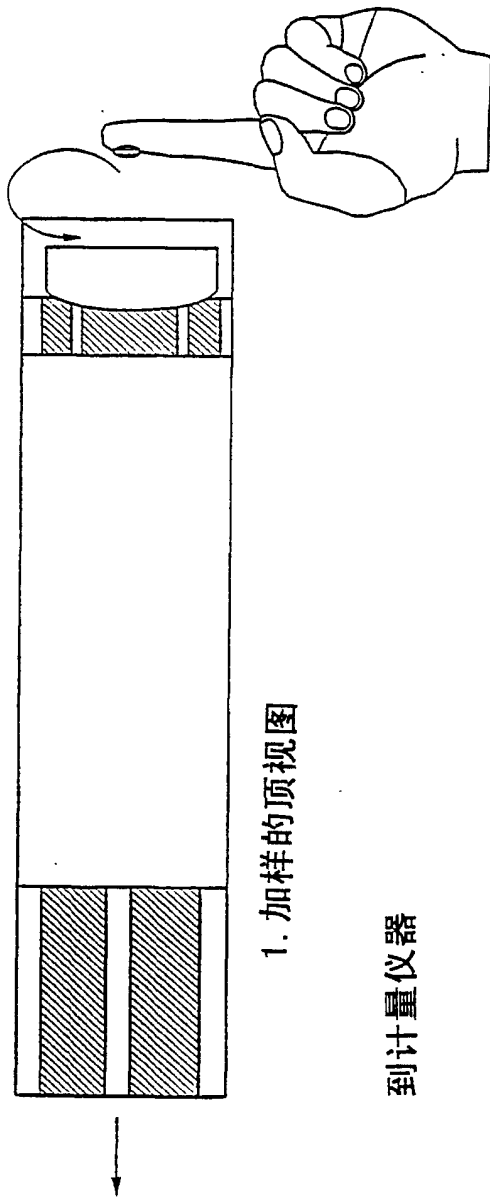


图 4A

到计量仪器

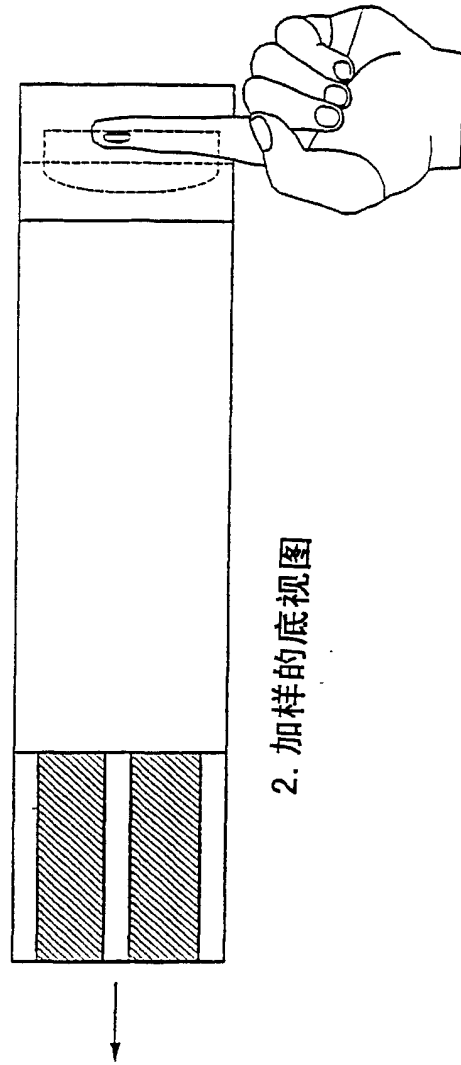


图 4B

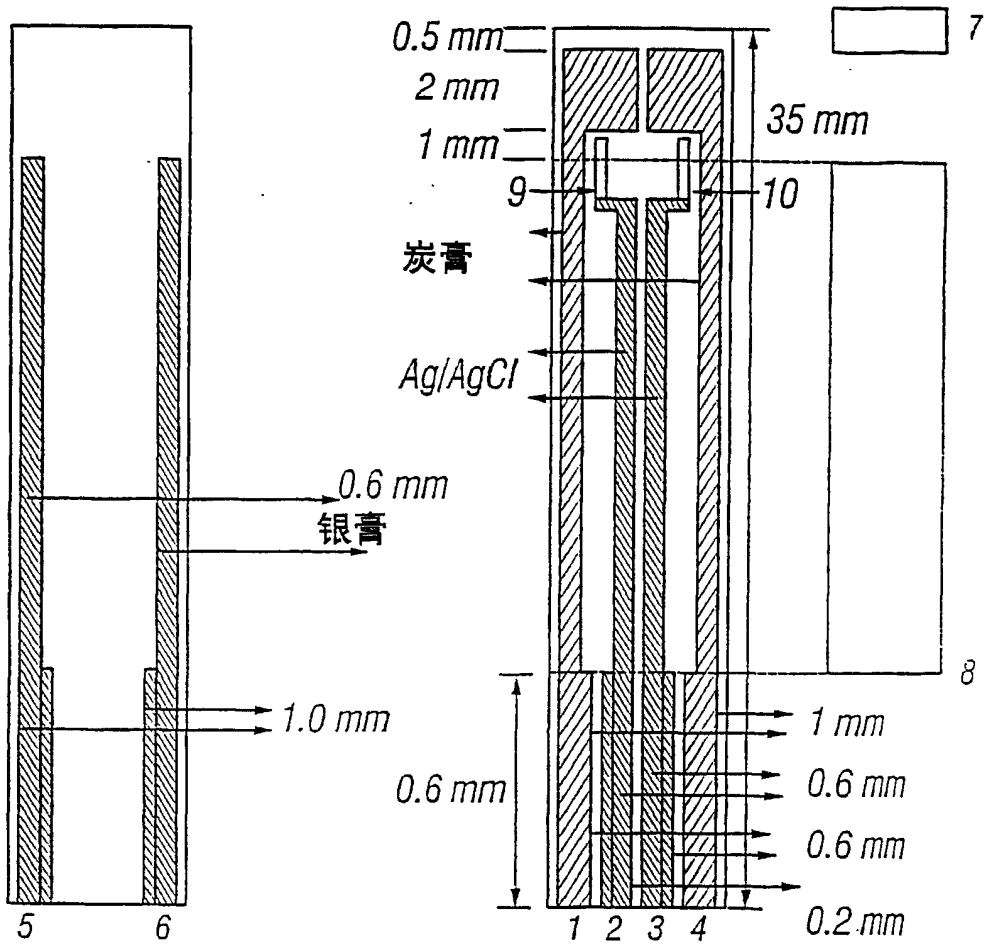


图 5A

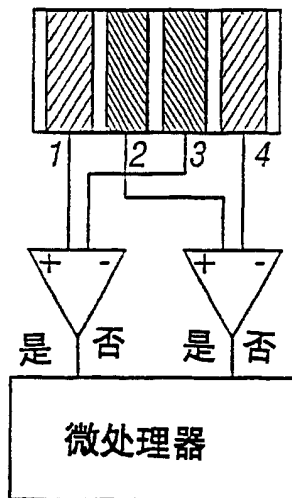


图 5B

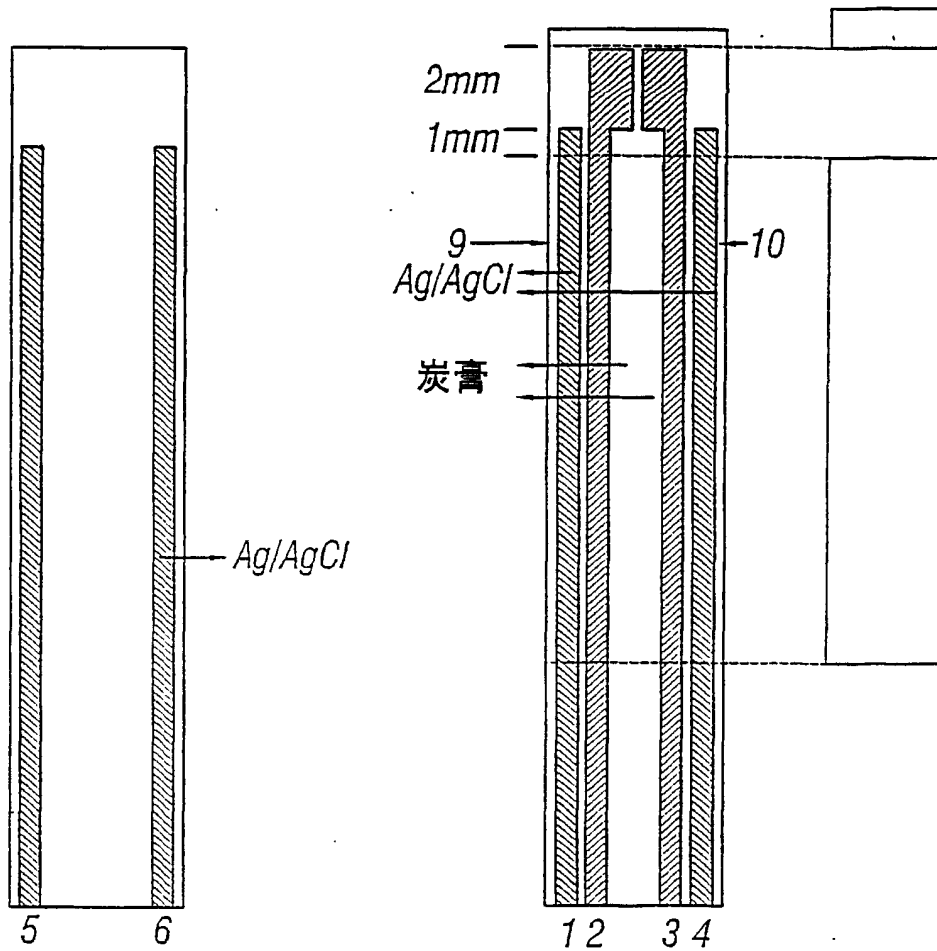


图 6A

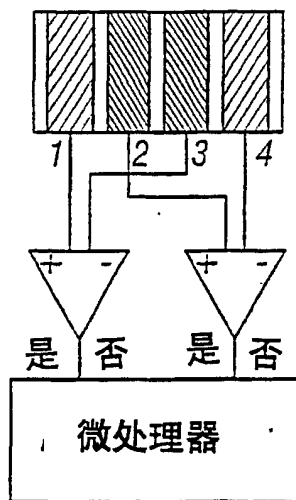


图 6B



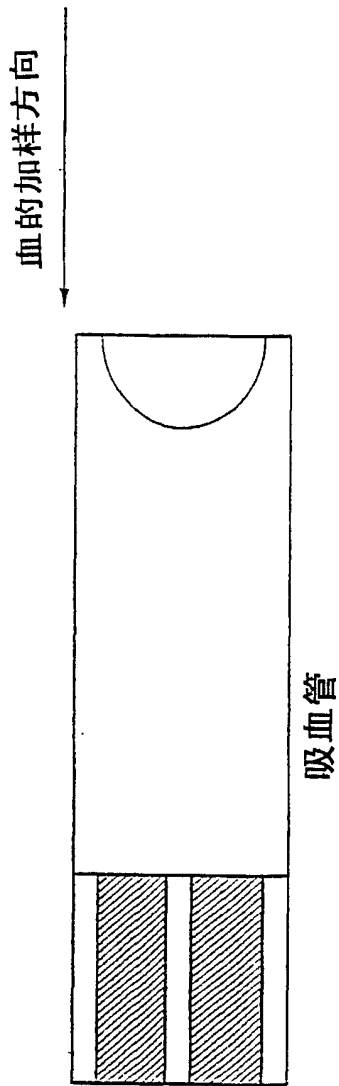


图 7A

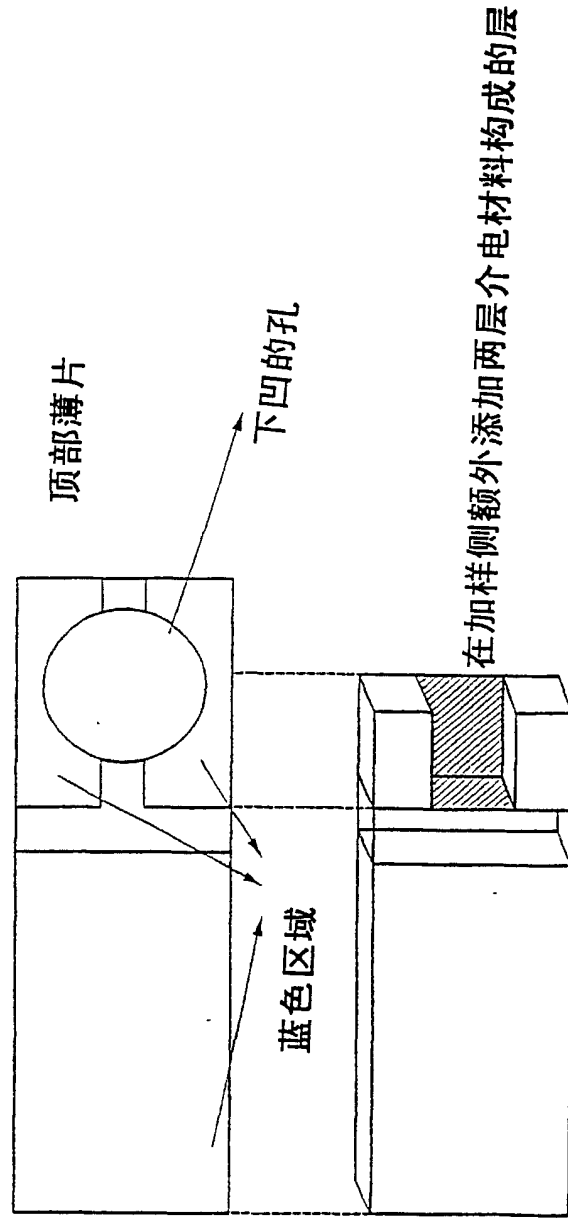


图 7B

图 7C

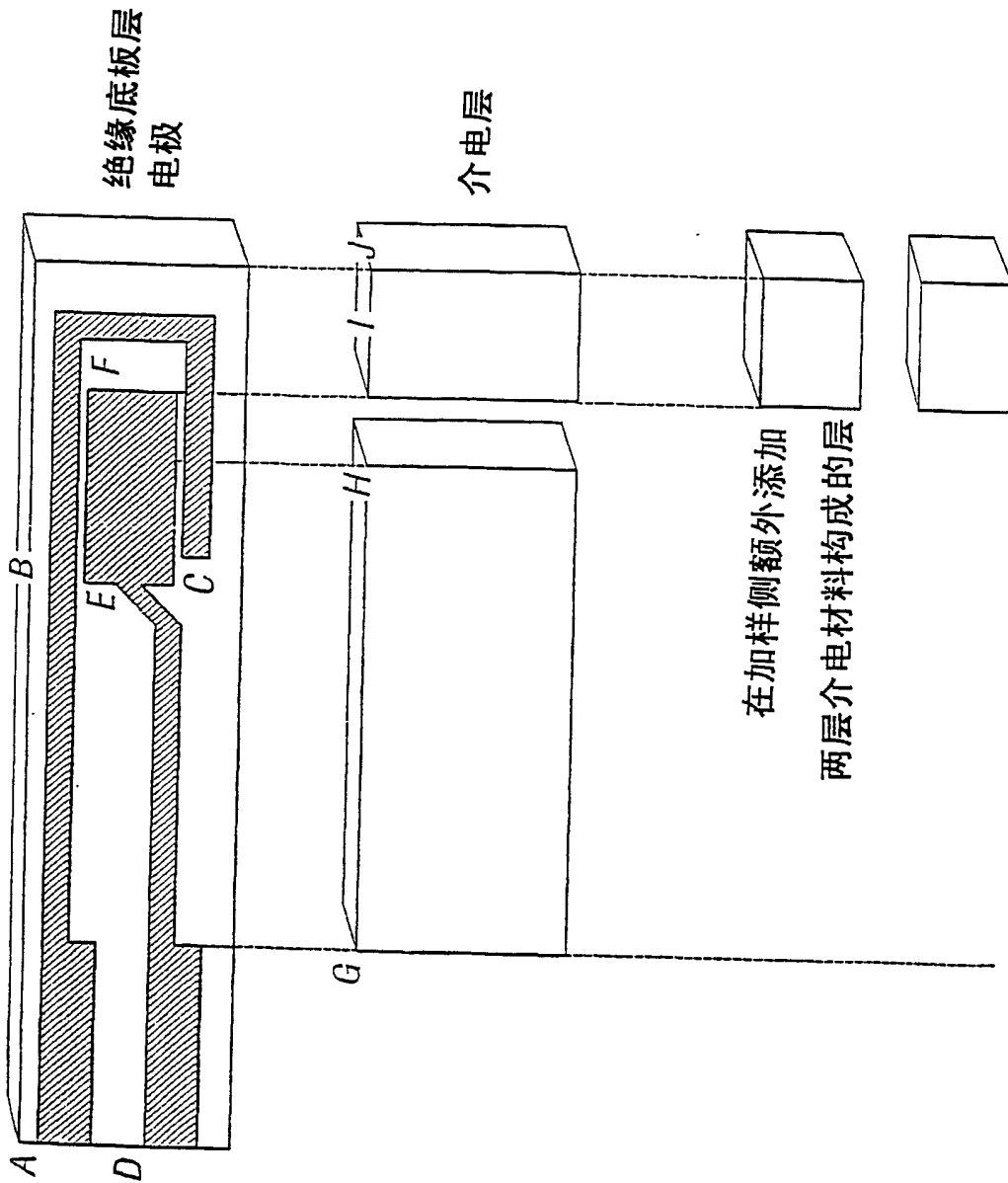


图 8A

图 8B

图 8C

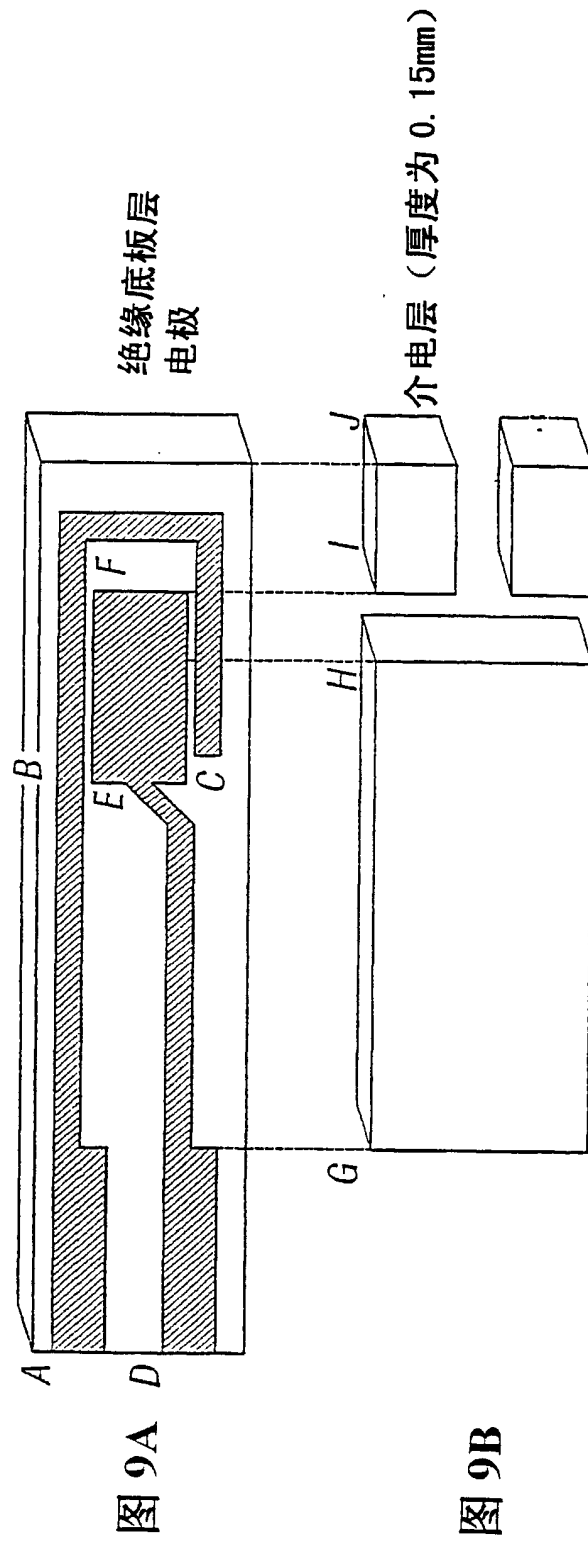


图9A

图9B

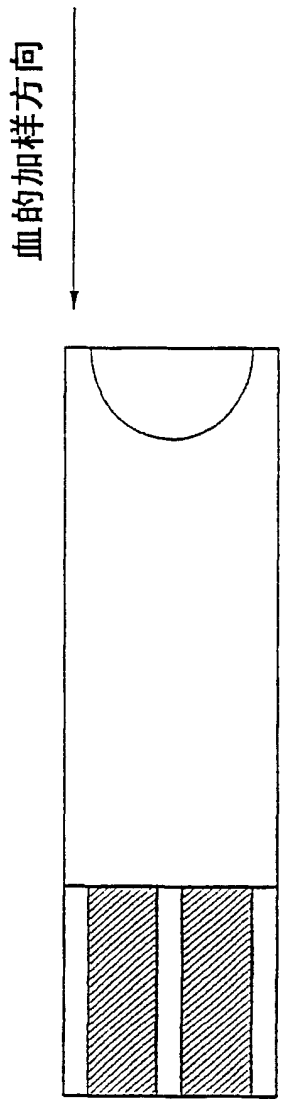


图 10A

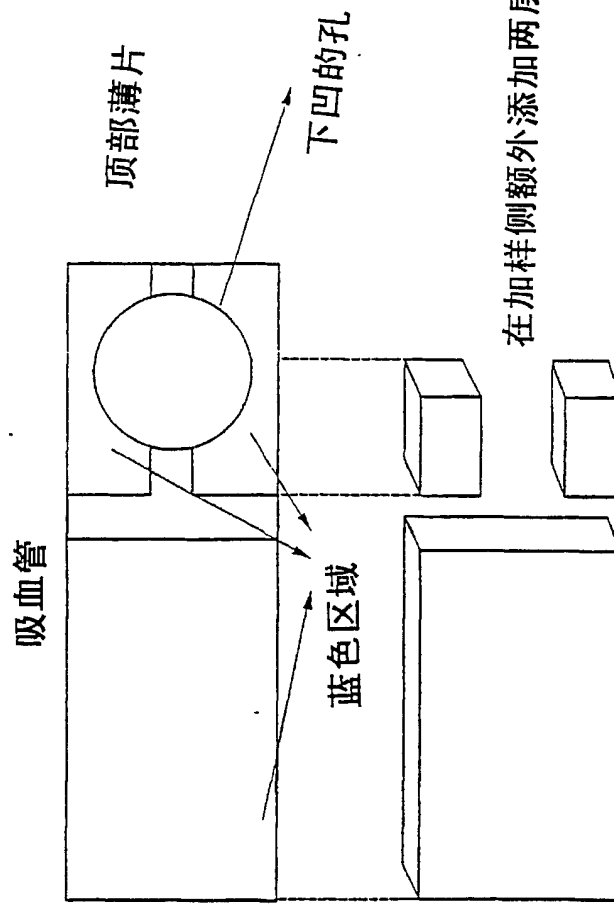


图 10B

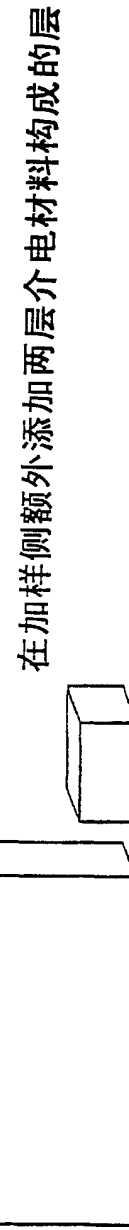


图 10C