

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680007118.0

[43] 公开日 2008 年 2 月 27 日

[11] 公开号 CN 101133162A

[22] 申请日 2006.3.3

[21] 申请号 200680007118.0

[30] 优先权

[32] 2005.3.4 [33] US [31] 60/658,634

[86] 国际申请 PCT/US2006/007875 2006.3.3

[87] 国际公布 WO2006/096619 英 2006.9.14

[85] 进入国家阶段日期 2007.9.4

[71] 申请人 拜尔保健有限公司

地址 美国纽约

[72] 发明人 A·H·查 H·G·斯普拉德林

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 胡国群

权利要求书 4 页 说明书 16 页 附图 6 页

[54] 发明名称

稳定在电化学生物传感器中的 PQQ 依赖性葡萄糖脱氢酶的活性

[57] 摘要

包含 GDH - PQQ 作为酶 - 辅因子并且丝网印刷在电化学生物传感器的工作和反电极上的试剂组合物, 通过正确选择组分来维持酶试剂的活性。优选的组合物包括亲水性聚合物、无定形的未处理的二氧化硅、缓冲液、表面活性剂和介体。例如, 该生物传感器可用于葡萄糖的电流测定。

1. 用于丝网印刷电化学生物传感器的试剂组合物，其包括
 - (a) 用于氧化生物样品中的葡萄糖的葡萄糖脱氢酶 (GDH) 和辅因子吡咯并喹啉醌 (PQQ)；
 - (b) 选自纤维素衍生物、天然树胶和凝胶以及水溶性合成聚合物的亲水性聚合物；
 - (c) 选自无定形的未处理的二氧化硅粉末、滑石、云母、硅藻土以及天然和改良粘土的增稠剂；
 - (d) 足以维持约 4.5 - 约 6.5 到 6.0 的 pH 的缓冲液；
 - (e) 表面活性剂；和
 - (f) 介体。
2. 权利要求 1 的试剂组合物，其中所述缓冲液是乙酸盐、柠檬酸盐或琥珀酸盐缓冲液。
3. 权利要求 1 的试剂组合物，其中所述表面活性剂是烷基芳基聚醚醇。
4. 权利要求 1 的试剂组合物，其中所述介体是铁氰化钾。
5. 权利要求 1 的试剂组合物，其中所述缓冲液为 5.0 - 6.0。
6. 权利要求 5 的试剂组合物，其中所述组合物具有约 60,000 - 约 180,000 cps (mPa·s) 的粘度。
7. 权利要求 1 的试剂组合物，其中所述亲水性聚合物是纤维素衍生物，选自羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。
8. 权利要求 7 的试剂组合物，其中所述亲水性聚合物是羟乙基纤维素。
9. 权利要求 1 的试剂组合物，其中所述增稠剂是无定形的未处理的二氧化硅粉末。
10. 权利要求 9 的试剂组合物，其中所述无定形的未处理的二氧化硅粉末是亲水性的。

11. 权利要求 1 的试剂组合物, 其中对于每毫克组合物总重量来说存在 1 - 8 个单位的所述 GDH-PQQ。

12. 权利要求 2 的试剂组合物, 其中所述缓冲液以约 30 - 约 200 mM 存在。

13. 权利要求 3 的试剂组合物, 其中基于所述组合物的总重量, 存在直到约 0.5 重量%的所述聚醚醇。

14. 权利要求 4 的试剂组合物, 其中基于所述组合物的总重量, 存在约 10 - 约 20 重量%的所述铁氰化钾。

15. 权利要求 7 的试剂组合物, 其中基于所述组合物的总重量, 存在约 2 - 约 10 重量%的所述纤维素衍生物。

16. 权利要求 9 的试剂组合物, 其中基于所述组合物的总重量, 存在约 1 - 约 6 重量%的所述无定形的未处理的二氧化硅粉末。

17. 权利要求 1 的试剂组合物, 其进一步包括约 5 - 约 50 mM 的氯化钙。

18. 电化学生物传感器, 其包括:

(a) 非多孔性基材;

(b) 安置在所述基材上的工作和反电极;

(c) 丝网印刷在所述电极上的试剂组合物, 所述组合物包括:

(1) 对于每毫克组合物总重量来说, 约 1 - 8 个单位的用于氧化生物样品中的葡萄糖的葡萄糖脱氢酶 (GDH) 和辅因子吡咯并喹啉醌 (PQQ);

(2) 选自纤维素衍生物、天然树胶和凝胶以及水溶性合成聚合物的亲水性聚合物;

(3) 选自无定形的未处理的二氧化硅粉末、滑石、云母、硅藻土以及天然和改良粘土的增稠剂;

(4) 足以维持约 4.5 - 约 6.5 的 pH 的缓冲液;

(5) 表面活性剂; 和

(6) 介体; 以及

(d) 用于所述电极和所述试剂组合物的防护罩。

19. 权利要求 18 的电化学生物传感器, 其中所述缓冲液是约 30 - 约 200 mM 的乙酸盐、柠檬酸盐或琥珀酸盐缓冲液。

20. 权利要求 18 的电化学生物传感器, 其中所述表面活性剂是基于所述组合物总重量计直到约 0.5 重量%的烷基芳基聚醚醇。

21. 权利要求 18 的电化学生物传感器, 其中所述介体是基于所述组合物总重量计约 10 - 约 20 重量%的铁氰化钾。

22. 权利要求 18 的电化学生物传感器, 其中包括足够量的组分(c) (2) 和 (c) (3), 以提供适合用于丝网印刷的组合物。

23. 权利要求 18 的电化学生物传感器, 其中所述组合物具有约 60,000 - 约 180,000 cps (mPa·s) 的粘度。

24. 权利要求 18 的电化学生物传感器, 其中所述亲水性聚合物是基于所述组合物总重量计约 2 - 约 10 重量%的纤维素衍生物, 选自羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。

25. 权利要求 24 的电化学生物传感器, 其中所述亲水性聚合物是羟乙基纤维素。

26. 权利要求 18 的电化学生物传感器, 其中所述增稠剂是基于所述组合物总重量计约 1 - 约 6 重量%的无定形的未处理的二氧化硅粉末。

27. 权利要求 26 的电化学生物传感器, 其中所述无定形的未处理的二氧化硅粉末是亲水性的。

28. 权利要求 18 的电化学生物传感器, 其中所述试剂组合物包括约 5 - 约 50 mM 的氯化钙。

29. 维持在用于电化学生物传感器中的经丝网印刷的试剂组合物之中葡萄糖脱氢酶 (GDH) 和辅因子吡咯并喹啉醌 (PQQ) 活性的方法, 包括将试剂组合物进行丝网印刷, 所述方法包括下列物质的作用:

(a) 用于氧化生物样品中的葡萄糖的葡萄糖脱氢酶 (GDH) 和辅因子吡咯并喹啉醌 (PQQ);

(b) 选自纤维素衍生物、天然树胶和凝胶以及水溶性合成聚合物的亲水性聚合物;

(c) 选自无定形的未处理的二氧化硅粉末、滑石、云母、硅藻土以及天然和改良粘土的增稠剂;

(d) 足以维持约 4.5 - 约 6.5 的 pH 的缓冲液;

(e) 表面活性剂; 和

(f) 介体。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述亲水性聚合物是纤维素衍生物, 选自羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。

31. 权利要求 29 的方法, 其中所述增稠剂是无定形的未处理的二氧化硅粉末。

32. 权利要求 29 的方法, 其中所述 pH 维持在 5.0 - 6.0。

稳定在电化学生物传感器中的 PQQ 依赖性葡萄糖脱氢酶的活性

发明领域

本发明总的来说旨在用于分析生物学流体的医学装置的领域。

发明背景

更具体而言，本发明涉及生物传感器，器用于测量体液中的分析物的量，特别是测量全血样品中的葡萄糖。光学方法通常用于进行此类测量，但本发明涉及电化学传感器的改良。

尽管本文将描述的本发明方法可以应用于测量其他分析物，但测量全血样品中的葡萄糖是特别感兴趣的。本发明还涉及电化学仪器，其中将恒定或变化的电势施加于接触血液样品的电极，并且在短时间段后测量所得到的电流。测得的电流与样品中的分析物的量相关。此类仪器称为电流计。

电流测量仪器中使用的葡萄糖生物传感器可以采用许多试剂系统，所述试剂系统使酶与样品中的葡萄糖反应，并通过称为介体的氧化还原化合物在下列一般步骤顺序中氧化而产生可测量的电流：



其中 $\text{E}_{\text{氧化}}$ 和 $\text{E}_{\text{还原}}$ 是氧化和还原形式的酶氧化还原中心，并且 $\text{Med}_{\text{氧化}}$ 和 $\text{Med}_{\text{还原}}$ 是氧化和还原形式的介体。葡萄糖氧化酶已用作电化学生物传感器中的酶，但最近，已引入了葡萄糖脱氢酶。这些酶与辅酶或辅因子，例如 NAD、FAD 和 PQQ 一起使用。在本领域技术人员所熟悉的

之中，介体尤其可以是铁氰化物或四唑鎓盐。

将葡萄糖脱氢酶（GDH）、其辅因子以及介体组合在施加至电极对的制剂中，所述电极对被描述为工作和反电极。当施加电势越过电极时，所述酶/辅因子氧化葡萄糖（分析物），并且当介体再氧化该酶时其被还原。还原的介体迁移至工作电极，在那里它被再氧化，并且在该过程中释放电子，所述电子移至反电极并建立电流，该电流与样品中存在的葡萄糖量成比例。

因为每当患者测试其血液葡萄糖量时使用一个新的传感器，所以试剂制剂应当在从一个生物传感器到下一个生物传感器之间提供一致表现。很明显，重要的是，结果是可靠的，因为用户将根据其测试结果来调整其饮食或药物治疗。因此，除了其他要求外，尤其是，酶应当在其整个有用的保存期内维持其活性。本发明特别涉及限制或防止在电化学生物传感器中使用的酶/辅因子系统[即，葡萄糖脱氢酶-吡咯并喹啉醌（GDH-PQQ）]的活性的丧失。

美国专利号 6,656,702 中提出了一种维持 GDH-PQQ 活性的方法，其教导了向试剂制剂中添加糖，特别是含 GDH-PQQ 的海藻糖。在一个例子中，将亲水性聚合物，羧甲基纤维素，沉积在电极上并干燥。然后，将包含 GDH-PQQ、海藻糖和作为电子受体（介体）的铁氰化钾的试剂混合物通过“滴下（dropping）”而沉积在干燥的羧甲基纤维素层上并随后干燥，以在电极上完成试剂层。该专利还建议，还可将亲水性聚合物加到包含试剂的层上。认为‘702 专利通过提及试剂层“滴下”来表示，它们通过将试剂小滴分配到围绕裸露电极的孔中来进行沉积。

另一专利（美国专利号 6,270,637）描述了用于电化学生物传感器的制剂，其包含 GDH-PQQ，并且还包含羧乙基纤维素。该专利强调了包含入分子量为 100-900 千道尔顿（kDa）的聚环氧乙烷的价值。没有详细提供将其制剂施加于电极上的方法，但相信这可以通过用泵系统分配试剂来完成。

试剂层的丝网印刷用于在美国专利号 5,708,247；5,951,836；和

6,241,862 中所描述的组合物和生物传感器。葡萄糖氧化酶用作所述酶,并且试剂组合物还包括羟乙基纤维素和经处理的二氧化硅,选择所述经处理的二氧化硅以具有疏水性和亲水性的平衡,从而形成将红细胞排除在外的二维网络。

试剂制剂可以通过各种方法进行沉积,包括浸渍、条纹涂覆(stripe coating)、喷墨印刷或使用注射泵的微沉积,所述注射泵可以包括添加微型电磁阀液滴喷射装置。丝网印刷是特别感兴趣的方法,因为它是有效的并且可良好地进行调整以适应生物传感器的大规模生产。它要求施加于电极的制剂(即,墨)具有某些物理性质以成功地进行施加。特别地,通过丝网印刷施加的墨应当具有下列性质:与基材的吸附性、内聚性、触变性(剪切稀化)、以及关于粘度和流动的最佳流变学。

本发明人发现,当葡萄糖氧化酶作为所述酶时用于丝网印刷的组合物在所述酶变成 GDH-PQQ 时不能使用,因为该新的酶很快丧失活性。研究后确定,用于提供丝网印刷所必需的物理性质的组分中的某些组分导致酶活性丧失。因此,必需发现不会导致 GDH-PQQ 过早失活且满足丝网印刷要求的组分。那些试剂制剂在下文描述。

发明概述

本发明在一个方面是用于施加至电化学生物传感器中的电极的试剂组合物。该新的组合物可以是经丝网印刷的,并避免用于在葡萄糖生物传感器中氧化葡萄糖的酶-辅因子系统(GDH-PQQ)活性的过早丧失。在一个优选实施方案中,在维持 pH 4.5 - 6.5 的缓冲溶液中将 GDH-PQQ 与下列物质组合:亲水性聚合物(优选羟乙基纤维素),和无定形的亲水性二氧化硅粉末,表面活性剂,以及介体(优选铁氰化物)。

在一个实施方案中,本发明是电化学生物传感器,其中将上述反应组合物丝网印刷在工作电极和反电极上。

在另一方面，本发明是用于维持在经丝网印刷的试剂组合物中 GDH-PQQ 活性的方法。

附图简述

图 1a 和 b 是典型的电化学传感器的分解图。

图 2 是试剂本底电流对不同缓冲液的图。

图 3 是直方图，其显示了试剂制剂中某些组分对酶活性的影响。

图 4 是直方图，其显示了本发明的试剂组合物对酶活性的影响。

图 5 是测得的葡萄糖对标准方法的图。

图 6 是图 5 的测量结果中的偏差的图。

优选实施方案的描述

测量血液葡萄糖含量

血液中包含的葡萄糖可以通过各种方法进行测量。其中特别感兴趣的是由糖尿病患者在家中使用的方法。这些方法包括光学和电化学方法，这两者都可以通过用酶氧化葡萄糖来起作用。存在的葡萄糖量通过测量经由指示剂显现的颜色或者通过测量当施加电势越过电极对时经由氧化还原介体的氧化而产生的电流来测定。本发明涉及后面一种测量全血葡萄糖含量的方法，特别是涉及采用葡萄糖脱氢酶(GDH)和辅因子吡咯并喹啉醌(PQQ)的电化学生物传感器。将 GDH-PQQ 与其他组分相组合以产生沉积在电极对上的组合物，所述其他组分包括介体、聚合物、表面活性剂、缓冲液和增稠剂。当施加电压越过所述电极时，GDH-PQQ 与葡萄糖的反应以及介体的氧化还原反应产生与血液样品中的葡萄糖量成比例的电流，所述血液样品与反应组合物进行了接触。

本发明不限于在本领域中已公开的许多中的特定生物传感器设计。可以使用的生物传感器的一个例子在美国专利号 6,531,040 中描

述，其在图 1a - b 中进行了图解说明。

图 1 中显示了生物传感器 10 的分解图。它包括绝缘性底座 12，在其上按顺序印刷了（一般通过丝网印刷技术）电导体图案（pattern）14、电极图案（部分 16 和 18）、绝缘（介电）图案 20、和反应层 22。通过添加覆盖层 28 完成了生物传感器。在覆盖层 28 和试剂层 22 之间形成的毛细管 30 为流体测试样品提供了流动通道。

试剂层 22 中的试剂与流体测试样品中的分析物（例如血液中的葡萄糖）反应并产生电流，所述电流被测量并与存在的分析物的量相关联。反应层 22 一般包含酶和电子受体。酶与分析物反应从而产生电子，其通过电子受体或介体被运送至工作电极表面，所述电子受体或介体响应分析物和酶之间的反应而被还原。在本发明中，所述酶是葡萄糖脱氢酶（GDH），和其辅因子吡咯并喹啉醌（PQQ），并且介体是铁氰化物盐。

电极图案的两个部分 16、18 提供通过电化学方法测定分析物浓度所需的分别的工作和反电极。所显示的设计的特征是，工作和反电极如此配置，使得反电极的主要部分位于工作电极 16a 的暴露部分的下游（依照沿着流动通道的流体流的方向）。

然而，反电极子元件 18a 置于工作电极上部元件 16a 的上游，从而使得当不足以完全覆盖工作电极的测试流体样品量（例如，全血样品）进入毛细管空间时，由于全血样品的传导性而在反电极子元件 18a 和工作电极 16a 的暴露部分之间形成电连接。然而，对于被全血样品接触来说可得的反电极面积是如此小，使得只有非常弱的电流可以通过电极之间，并且因而通过电流检测器。通过安排电流检测器在当接受到的信号低于某一预定水平时给出错误信号，传感器装置通知用户不充足的血液已进入传感器腔，并且应当进行另一测试，或应当添加更多血液。尽管电极的具体尺寸不是关键的，但反电极子元件 18a 的面积通常比工作电极的小约 10%，并且更具体而言，小约 6%。这个元件应当制备得尽可能小。

美国专利号 6,531,040 中还考虑了通过生产不将试剂墨印刷在反

电极子元件 18a 上的丝网,反应层 22 可以不与反电极子元件 18a 接触。这将使该子元件缺乏试剂,由此不允许其起适当反电极的作用,从而使得当测试流体样品不能接触反电极 18 的主体时达到错误条件。尽管子元件 18a 显示为与反电极 18 的部分物理连接,但 18a 可以与反电极的其余部分在物理上分离,条件是其具有自己的连接器,并且传感器配备有与检测器的第三个接触器。

工作和反电极一般使用电极墨进行印刷,所述电极墨一般为约 $14\text{ }\mu\text{m}$ ($0.00055''$) 厚,并且通常包含电化学活性炭。导体墨的组分可以是炭和银的混合物,选择该混合物以在电极和仪表之间提供低化学电阻途径 (chemical resistance path),所述电极经由在传感器的鱼形尾端 26 与传导图案接触而连接至所述仪表。反电极可以包括银/氯化银,尽管炭是优选的。为了增强仪表读数的可重复性,介电图案使电极与流体测试样品之间绝缘,除了在电极图案 24 中心附近的限定区域外。限定区域在这种类型的电化学测定中是重要的,因为测得的电流不仅取决于分析物浓度和反应层 22 的面积,还取决于暴露于包含分析物的测试样品的工作电极 16a 的面积。

典型的介电层 20 包括 UV 固化的丙烯酸酯修饰的单体、寡聚物或聚合物,并且约 $10\text{ }\mu\text{m}$ ($0.0004''$) 厚。介电层还可以是可湿固化或可热固化的。调整盖或覆盖物 28 以适合于匹配底座以形成接受流体测试样品的空间,在所述空间中放置反电极和工作电极。盖 28 提供了凹型空间 30,并且一般通过对可变形材料的平片材进行压纹而形成。将盖 28 穿孔以提供通气孔 32 并通过密封操作与底座 12 连接。盖和底座可以通过声波焊接而密封在一起,在所述声波焊接中首先将底座 12 和盖 28 对准,然后在振动热封部件或角和固定颚板之间压在一起,其中只与盖的平坦且未压纹的区域接触。压纹的盖和底座还可通过在盖的下面使用粘性材料进行连接。连接盖和底座的方法在美国专利号 5,798,031 中更全面地进行了描述。

用于绝缘性底座 12 的合适材料包括聚碳酸酯,聚对苯二甲酸乙二醇酯,在空间上稳定的烯类聚合物和丙烯酸酯类聚合物,和聚合物掺和

物例如聚碳酸酯/聚对苯二甲酸乙二酯,和金属箔结构(例如尼龙/铝/聚氯乙稀薄片)。盖通常由可变形的聚合片状材料制造,例如聚碳酸酯或可压纹等级的聚对苯二甲酸乙二酯、甘醇修饰的聚对苯二甲酸乙二酯或金属箔组合物(例如,铝箔结构)。

在本发明中可以使用其他电化学传感器。可以用于测量葡萄糖浓度的电化学传感器的例子是在 Bayer HealthCare's Ascensia™ AUTODISC®和 Ascensia™ ELITE®系统中使用的那些。关于此类电化学传感器的更多细节在美国专利号 5,120,420 和 5,320,732 中可以找到。其他电化学传感器可从 Matsushita Electric Industrial Company 获得。可以在电流分析监测系统中使用的电化学传感器的进一步例子在美国专利号 5,429,735 中公开。

电化学传感器可以位于装载有多个传感器的血糖传感器分配仪器中。在传感器分配仪器中装载的传感器包(pack)的一个例子在美国专利号 5,660,791 中公开。

当电化学传感器置于合适的测量仪器中并且引入血液样品时,施加电压越过电极并测量与样品的葡萄糖含量相关联的电流,并报告给用户。

电流分析传感器可以施加固定电压越过电极,并且在预定时间段内测量产生的电流,所述时间段可以非常短,比如说 5-10 秒,以便校正由于介体的过早还原而可能存在的偏差。那个时期称为“燃烧期”。电流升高至峰值并随后降低,同时样品再水化试剂层,使得氧化和还原反应发生。这个燃烧期后,去除所施加的电势或至少在允许反应发生的静止期内降低。然后,再施加电势并在预定的“阅读”期(例如,10 秒)内测量电流。因为由于酶的伴随氧化而出现还原的介体,所以产生的电流在开始时很高,但随后渐近地降低并接近稳定状态。在短“阅读”期结束时记录的电流用于确定血液样品的葡萄糖含量,这通过在阅读期结束时的电流和包含在测试样品中的具有已知浓度的葡萄糖之间的以前获得的相关性来进行。

反应组合物

与电化学生物传感器中的血液样品反应的组合物必须在从一个传感器到下一个传感器之间提供一致的应答。一致的应答对于依赖结果来调整其饮食或药物治疗的用户来说是重要的。它遵循这点：在生物传感器的保存期内试剂活性的改变应尽可能小，但至少是可预知的，从而使得可以进行结果的调整。本发明解决了在电化学生物传感器中使用酶-辅因子 GDH-PQQ 时发现的问题，在所述电化学生物传感器中将反应组合物丝网印刷在传感器的电极上。本发明人发现，在丝网印刷中通常使用的组分中的 GDH-PQQ 引起 GDH-PQQ 丧失活性。

GDH-PQQ 与作为氧化还原介体的铁氰化钾的混合物在一系列缓冲液中进行制备。尽管已知 GDH-PQQ 优选中性 pH，但发现提供约 4.5 - 约 6.5，更特别地，约 5.0 - 约 6.0 的 pH 的缓冲液，包括乙酸盐、柠檬酸盐和琥珀酸盐缓冲液，是更理想的，因为介体铁氰化物在酸性 pH 下更稳定（参见图 2）。

发现某些聚合材料也显示导致活性丧失，即使当使用低 pH 缓冲液时。用于形成酶和氧化还原介体的载体的两种聚合物用 75 mM 乙酸钠和 75 mM 琥珀酸钠缓冲液进行测试。不包括铁氰化钾。结果显示于图 3 中，其中显示了对酶活性的最初影响，并与在 -20℃ 下 2 周后的影响进行了比较。可以看出，当在包含 8.8 单位 GDH-PQQ/毫克试剂墨（reagent ink）和 10 mM CaCl_2 的溶液（但无铁氰化物）中只存在琥珀酸盐和乙酸盐缓冲液时，在 -20℃ 下 2 周后所述缓冲液并不导致活性明显丧失。使用 Beckman SYNCHRON CX 4[®] Delta 仪器通过在 560 nm 处测量用吩嗪硫酸甲酯（phenazine methosulfate, PMS）于 37℃ 还原硝基四氮唑蓝（nitrotetrazolium blue, NBT）而形成的二甲（diformazan）形成速率来测定酶活性。然而，当包括以前用于制备丝网印刷墨的添加剂时，看到活性明显丧失。将由 RHEOX, Inc. 供应的膨润土（一种粘土增稠剂）以 1.3 重量% 包括在缓冲溶液中。图 3 中显示的结果表明，在乙酸盐缓冲液中，膨润土导致酶活性丧失约 10%，而在琥珀酸盐缓冲液中，从新鲜试剂中并且还从在 -20℃ 贮存 2

周的试剂中丧失约 90% 的酶活性。当将 7.4 重量 % 的聚环氧乙烷加入缓冲溶液中时, 活性同样丧失, 尽管缓冲液的效果的差异是显著的。可以得出这样的结论, 包含与膨润土或聚环氧乙烷相组合的 GDH-PQQ 的试剂制剂显示出较低的酶活性, 并且因此是可丝网印刷的试剂墨中较不理想的增稠组分。

可能适合替代膨润土和聚环氧乙烷的其他增稠剂的影响的研究导致发现, 某些材料产生出适合于丝网印刷且不引起 GDH-PQQ 活性丧失的试剂墨。改善的结果在图 4 中图解说明。在图 4 中报告的测试中, 向乙酸盐缓冲溶液中加入 4 - 8 u/mg GDH-PQQ、1.6 重量 % CAB-O-SIL M5[®] 未处理的火成二氧化硅、4.5 - 6.5 重量 % 羟乙基纤维素 (HEC) 和几种表面活性剂。使用 PMS/NBT 酶测定法在 Beckman 分析仪上于 37℃ 测量酶活性。CAB-O-SIL M5[®] 适合与 HEC 组合。很明显, CAB-O-SIL M5[®] 与 HEC 的组合在测试期内并不导致酶活性丧失。

如已显示的, 羟乙基纤维素在使用 GDH-PQQ 的电化学生物传感器中可以用作试剂层中的基质组分, 而不导致酶活性的不适当丧失。还可使用其他相关的亲水性聚合物以使得组合物的粘度适合于丝网印刷。其他纤维素衍生物包括, 但不限于, 羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟乙基纤维素或羟丙基甲基纤维素。可能有用的其他水溶性聚合物包括黄原胶、瓜耳胶、刺槐豆胶、角叉菜胶、琼脂糖和合成聚合物, 所述合成聚合物包括聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮等。

CAB-O-SIL M5[®] 是无定形的未处理的火成二氧化硅, 其已显示出向在本发明试剂层的丝网印刷中使用的墨提供了所需的物理性质。这种未处理的亲水性二氧化硅不同于在几个早期专利中教导的用于平衡疏水和亲水性质的经处理的二氧化硅。备选的水不溶性增稠剂包括, 但不限于, 滑石、云母、硅藻土、天然和变性粘土, 例如皂土 (bentonite clays)、锂蒙脱土 (hectorite clays) (例如, 来自 IMV Nevada 的 Optigel sH)、海泡石 (例如来自 IMV Nevada 的 Sepiogel F)、蒙脱石 (例如来自 IMV Nevada 的 IGB 粘土)、皂石 (saponite) (例如, 来自 IMV Nevada 的 Sepiogel F 和 IMVITE 1016, 以及来自 Southern

clay products 的 Laponite), 等等。

如图 4 中所示, 表面活性剂的选择也可影响 GDH-PQQ 的活性。由 Sigma 供应的 Triton x-100 (一种烷基芳基聚醚醇) 是非常合适的。然而, 认为其他表面活性剂, 包括 FC 170C (3M 的产品)、Surfynol 485 (Air Products and Chemicals, Inc. 的产品) 和 Pluronic L62 D (BASF 的产品), 可用于本发明的制剂中。

根据本发明用于对生物传感器进行丝网印刷的优选试剂组合物包括:

- 约 30 - 约 200 mM, 并且更特别地, 约 50 - 约 150 mM 的缓冲液, 优选乙酸钙;
- 约 5 - 约 50 mM CaCl_2 ;
- 基于组合物总重量计直到约 0.5 重量% 的表面活性剂;
- 基于组合物总重量计约 2 - 约 10 重量% 的纤维素衍生物, 优选羟乙基纤维素;
- 基于组合物总重量计约 1 - 约 6 重量% 的无定形的未处理的二氧化硅;
- 基于组合物总重量计约 10 - 约 20 重量% 的作为介体的铁氰化钾;
- 对于每毫克组合物总重量来说约 1 - 约 8 个单位的 GDH-PQQ 酶-辅因子;
- 约 60,000 - 约 180,000 cps (mPa·s) 的粘度。

实施例 1

通过加入乙酸钙和冰乙酸来制备 pH5.3 的 75 mM 乙酸钙缓冲液。向缓冲溶液中加入下列化合物: 10 mM CaCl_2 、0.05 重量% Triton X-100 表面活性剂、1 - 3 重量% Cabosil M5 无定形的未处理的火成二氧化硅粉末、和 4 - 8 重量% 羟乙基纤维素。在让二氧化硅和纤维素

水合 16 小时后, 向每毫克试剂墨中加入 15 - 20 重量 % 的铁氰化钾和 3 - 8 个单位的 GDH-PQQ。试剂墨在 600 rpm 下用叶片式混合器混合约 10 - 20 分钟, 从而产生粘度为约 80,000 - 140,000 cps 的试剂组合物。

将该试剂组合物丝网印刷在包含电极的基材上, 并于 45 - 50°C 干燥 5 分钟。

实施例 2

使用实施例 1 的试剂组合物制备葡萄糖传感器, 并用包含已知葡萄糖含量且具有 40 % 血细胞比容的血液样品进行测试。对电极施加 200 - 400 毫伏的电势, 并将在施加电势后 10 秒测量的电流用于确定样品的葡萄糖含量。这些测试的结果显示于图 5 中, 其中将计划在 10 秒测试时间中的 Ascensia™ AUTODISC® 葡萄糖计的应答针对通过工业标准 YSI 葡萄糖仪器测得的葡萄糖含量进行作图。可以看出获得了线性应答, 其对所研究的范围内的酶-辅因子浓度相对不敏感。

当与从 YSI 仪器 (工业标准) 获得的结果相比较时, 该传感器同样展现了良好的剂量应答。相对于 YSI 仪器结果的偏差显示于图 6 中。对于含 ≤ 400 mg/dL 葡萄糖的样品, 偏差在 $\pm 5\%$ 内, 对于含 680 mg/dL 葡萄糖的样品, 偏差在 $\pm 10\%$ 内。

备选的实施 A

用于丝网印刷电化学生物传感器的试剂组合物, 其包括:

(a) 用于氧化生物样品中的葡萄糖的葡萄糖脱氢酶 (GDH) 和辅因子吡咯并喹啉醌 (PQQ);

(b) 选自纤维素衍生物、天然树胶和凝胶以及水溶性合成聚合物的亲水性聚合物;

(c) 选自无定形的未处理的二氧化硅粉末、滑石、云母、硅藻土以及天然和改良粘土的增稠剂;

(d) 足以维持约 4.5 - 约 6.5 到 6.0 的 pH 的缓冲液;

(e) 表面活性剂; 和

(f) 介体。

备选的实施方案 B

备选的实施方案 A 的试剂组合物, 其中所述缓冲液是乙酸盐、柠檬酸盐或琥珀酸盐缓冲液。

备选的实施方案 C

备选的实施方案 A 的试剂组合物, 其中所述表面活性剂是烷基芳基聚醚醇。

备选的实施方案 D

备选的实施方案 A 的试剂组合物, 其中所述介体是铁氰化钾。

备选的实施方案 E

备选的实施方案 A 的试剂组合物, 其中所述缓冲液为 5.0 - 6.0。

备选的实施方案 F

备选的实施方案 E 的试剂组合物, 其中所述组合物具有约 60,000 - 约 180,000 cps (mPa·s) 的粘度。

备选的实施方案 G

备选的实施方案 A 的试剂组合物, 其中所述亲水性聚合物是纤维素衍生物, 选自羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。

备选的实施方案 H

备选的实施方案 G 的试剂组合物, 其中所述亲水性聚合物是羟乙基纤维素。

备选的实施方案 I

备选的实施方案 A 的试剂组合物, 其中所述增稠剂是无定形的未处理的二氧化硅粉末。

备选的实施方案 J

备选的实施方案 I 的试剂组合物, 其中所述无定形的未处理的二氧化硅粉末是亲水性的。

备选的实施方案 K

备选的实施方案 A 的试剂组合物, 其中对于每毫克组合物总重量来说存在 1 - 8 个单位的所述 GDH-PQQ。

备选的实施方案 L

备选的实施方案 B 的试剂组合物, 其中所述缓冲液以约 30 - 约 200 mM 存在。

备选的实施方案 M

备选的实施方案 C 的试剂组合物, 其中基于所述组合物的总重量, 存在直到约 0.5 重量% 的所述聚醚醇。

备选的实施方案 N

备选的实施方案 D 的试剂组合物, 其中基于所述组合物的总重量, 存在约 10 - 约 20 重量% 的所述铁氰化钾。

备选的实施方案 O

备选的实施方案 G 的试剂组合物, 其中基于所述组合物的总重量, 存在约 2 - 约 10 重量% 的所述纤维素衍生物。

备选的实施方案 P

备选的实施方案 I 的试剂组合物, 其中基于所述组合物的总重量, 存在约 1 - 约 6 重量% 的所述无定形的未处理的二氧化硅粉末。

备选的实施方案 Q

备选的实施方案 A 的试剂组合物, 其进一步包括约 5 - 约 50 mM 的氯化钙。

备选的实施方案 R

电化学生物传感器, 其包括:

- (a) 非多孔性基材;
- (b) 安置在所述基材上的工作和反电极;
- (c) 丝网印刷在所述电极上的试剂组合物, 所述组合物包括:
 - (1) 对于每毫克组合物总重量来说, 约 1 - 8 个单位的用于氧化生物样品中的葡萄糖的葡萄糖脱氢酶 (GDH) 和辅因子吡咯并喹啉醌 (PQQ);
 - (2) 选自纤维素衍生物、天然树胶和凝胶以及水溶性合成聚

合物的亲水性聚合物;

(3) 选自无定形的未处理的二氧化硅粉末、滑石、云母、硅藻土以及天然和改良粘土的增稠剂;

(4) 足以维持约 4.5 - 约 6.5 的 pH 的缓冲液;

(5) 表面活性剂; 和

(6) 介体; 以及

(d) 用于所述电极和所述试剂组合物的防护罩。

备选的实施方式 S

备选的实施方式 R 的电化学传感器, 其中所述缓冲液是约 30 - 约 200 mM 的乙酸盐、柠檬酸盐或琥珀酸盐缓冲液。

备选的实施方式 T

备选的实施方式 R 的电化学传感器, 其中所述表面活性剂是基于所述组合物总重量计直到约 0.5 重量%的烷基芳基聚醚醇。

备选的实施方式 U

备选的实施方式 R 的电化学传感器, 其中所述介体是基于所述组合物总重量计约 10 - 约 20 重量%的铁氰化钾。

备选的实施方式 V

备选的实施方式 R 的电化学传感器, 其中包括足够量的组分 (c) (2) 和 (c) (3), 以提供适合用于丝网印刷的组合物。

备选的实施方式 W

备选的实施方式 R 的电化学传感器, 其中所述组合物具有约 60,000 - 约 180,000 cps (mPa·s) 的粘度。

备选的实施方式 X

备选的实施方式 R 的电化学传感器, 其中所述亲水性聚合物是基于所述组合物总重量计约 2 - 约 10 重量%的纤维素衍生物, 选自羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。

备选的实施方式 Y

备选的实施方式 X 的电化学传感器, 其中所述亲水性聚合物是羟乙基纤维素。

备选的实施方式 Z

备选的实施方式 R 的电化学传感器，其中所述增稠剂是基于所述组合物总重量计约 1 - 约 6 重量%的无定形的未处理的二氧化硅粉末。

备选的实施方式 AA

备选的实施方式 Z 的电化学传感器，其中所述无定形的未处理的二氧化硅粉末是亲水性的。

备选的实施方式 BB

备选的实施方式 R 的电化学传感器，其中所述试剂组合物包括约 5 - 约 50 mM 的氯化钙。

备选的过程 CC

维持在用于电化学传感器中的丝网印刷的试剂组合物之中葡萄糖脱氢酶 (GDH) 和辅因子吡咯并喹啉酮 (PQQ) 活性的方法，包括将试剂组合物进行丝网印刷，所述方法包括下列物质的作用：

(a) 用于氧化生物样品中的葡萄糖的葡萄糖脱氢酶 (GDH) 和辅因子吡咯并喹啉酮 (PQQ)；

(b) 选自纤维素衍生物、天然树胶和凝胶以及水溶性合成聚合物的亲水性聚合物；

(c) 选自无定形的未处理的二氧化硅粉末、滑石、云母、硅藻土以及天然和改良粘土的增稠剂；

(d) 足以维持约 4.5 - 约 6.5 的 pH 的缓冲液；

(e) 表面活性剂；和

(f) 介体。

备选的过程 DD

备选的过程 CC 的方法，其中所述亲水性聚合物是纤维素衍生物，选自羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。

备选的过程 EE

备选的过程 CC 的方法，其中所述增稠剂是无定形的未处理的二氧

化硅粉末。

备选的过程 FF

备选的过程 CC 的方法，其中所述 pH 维持在 5.0 - 6.0。

尽管本发明容许各种修饰和备选的形式，但具体实施方案举例显示在附图中，并详细描述。然而，应当理解，并不希望将本发明限制于所公开的具体形式，相反地，本发明将涵盖落入在所附权利要求中限定的本发明精神和范围内的所有修饰、等价方案和备选方案。

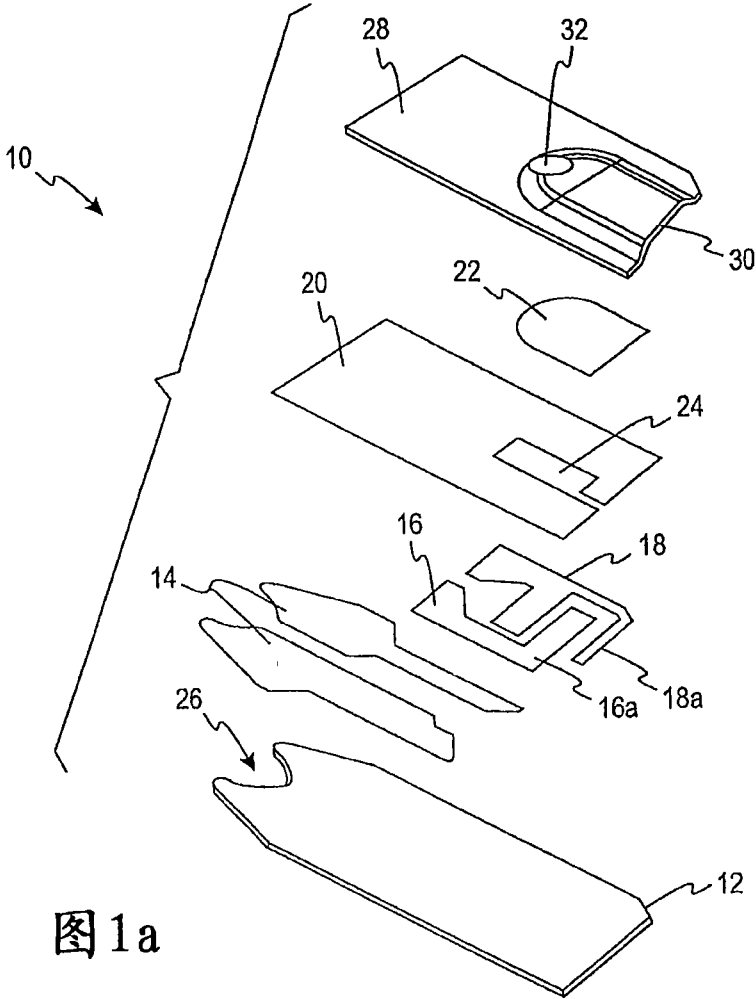


图 1a

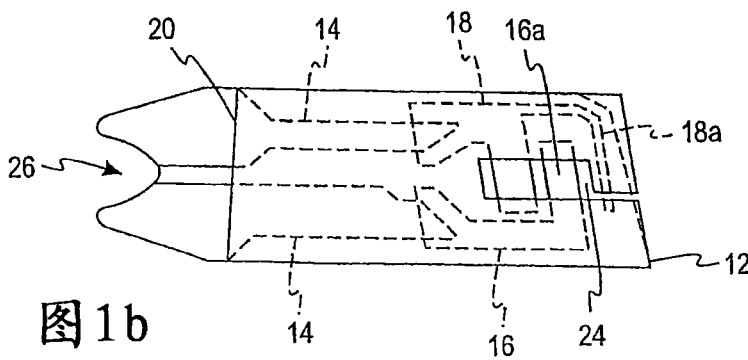


图 1b

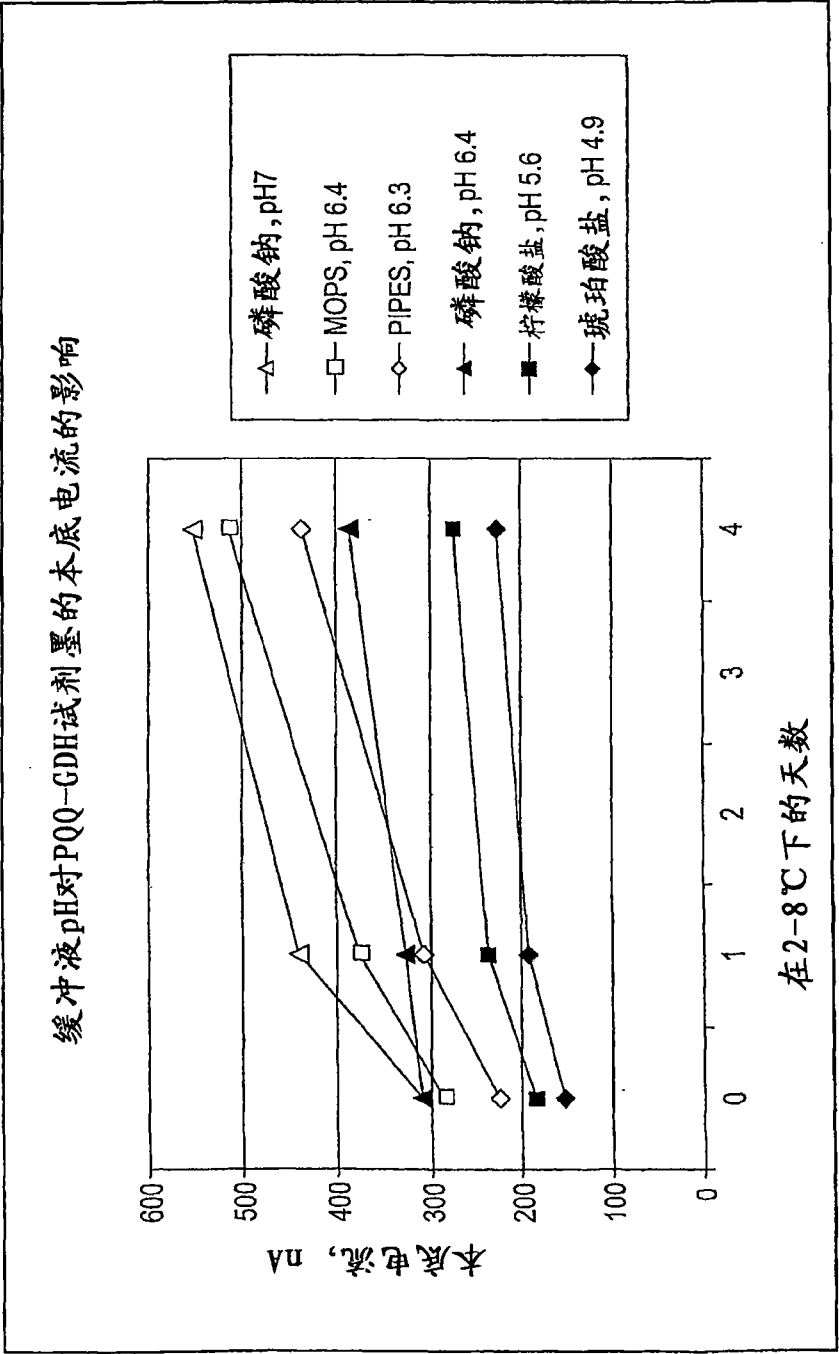


图2

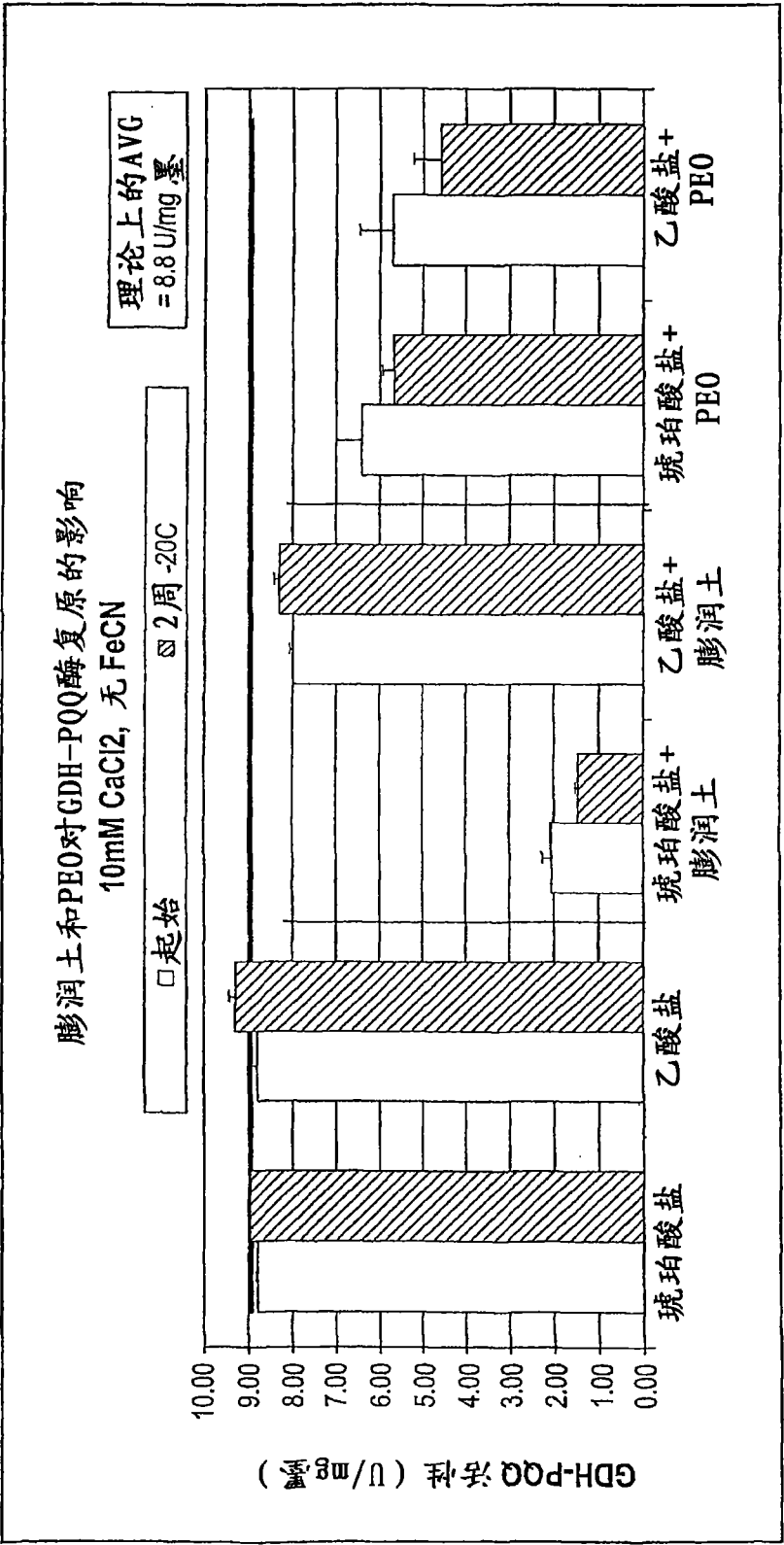


图3

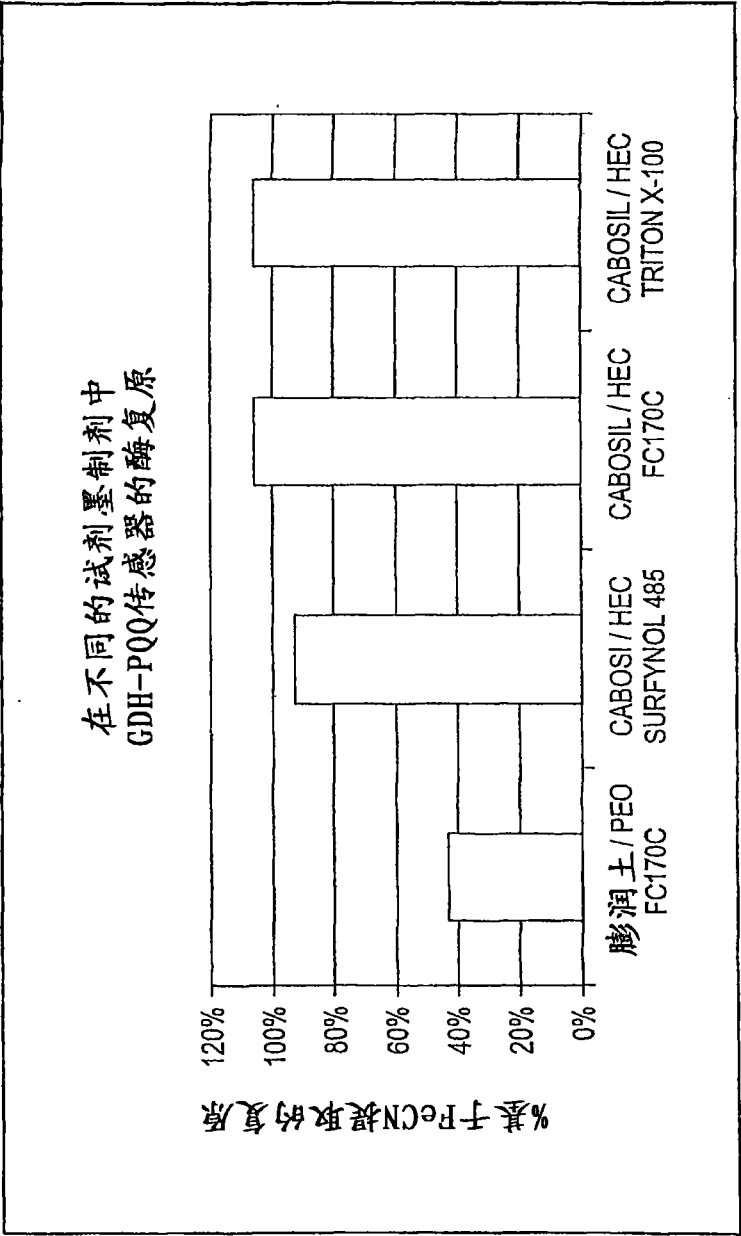


图 4

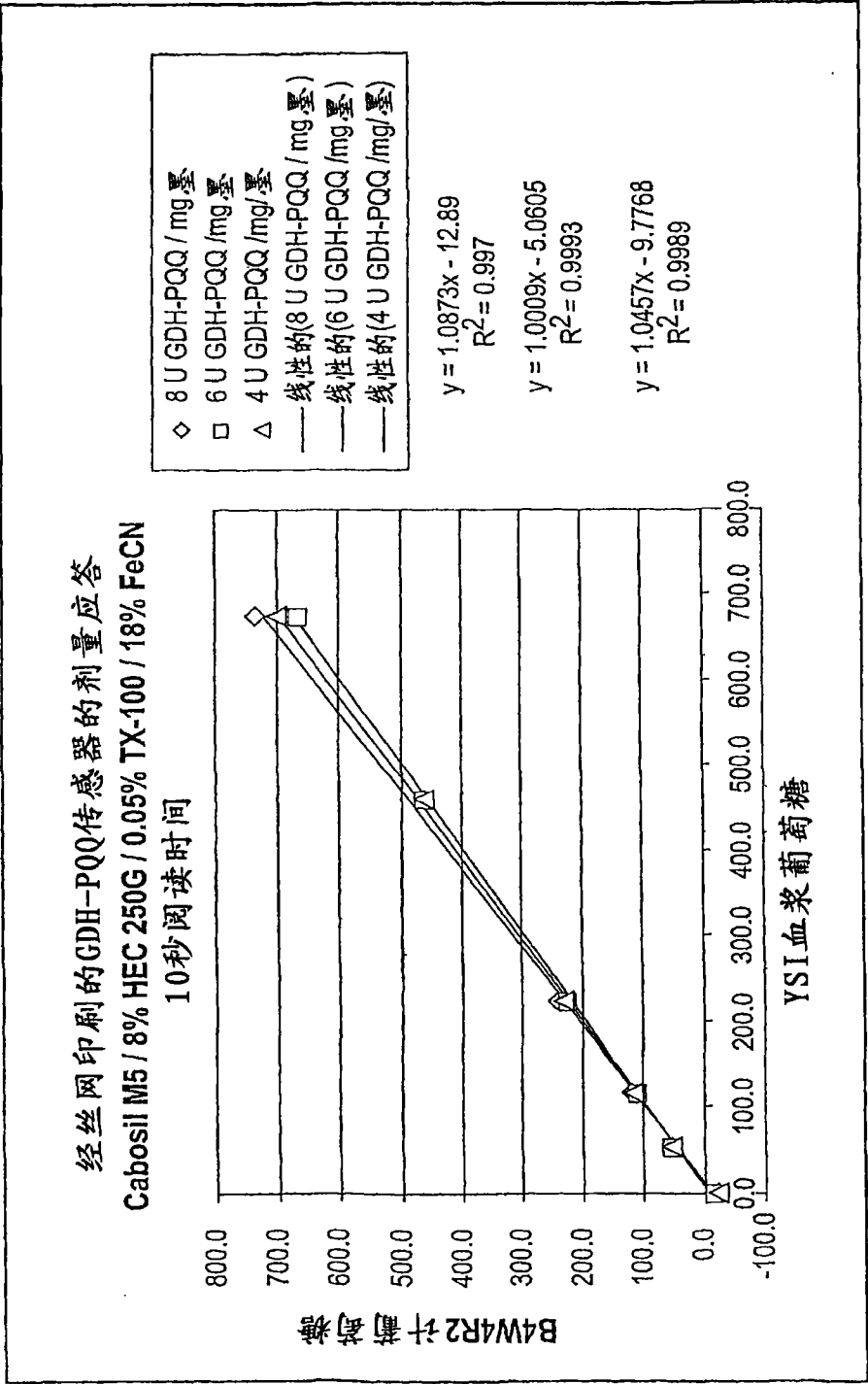


图5

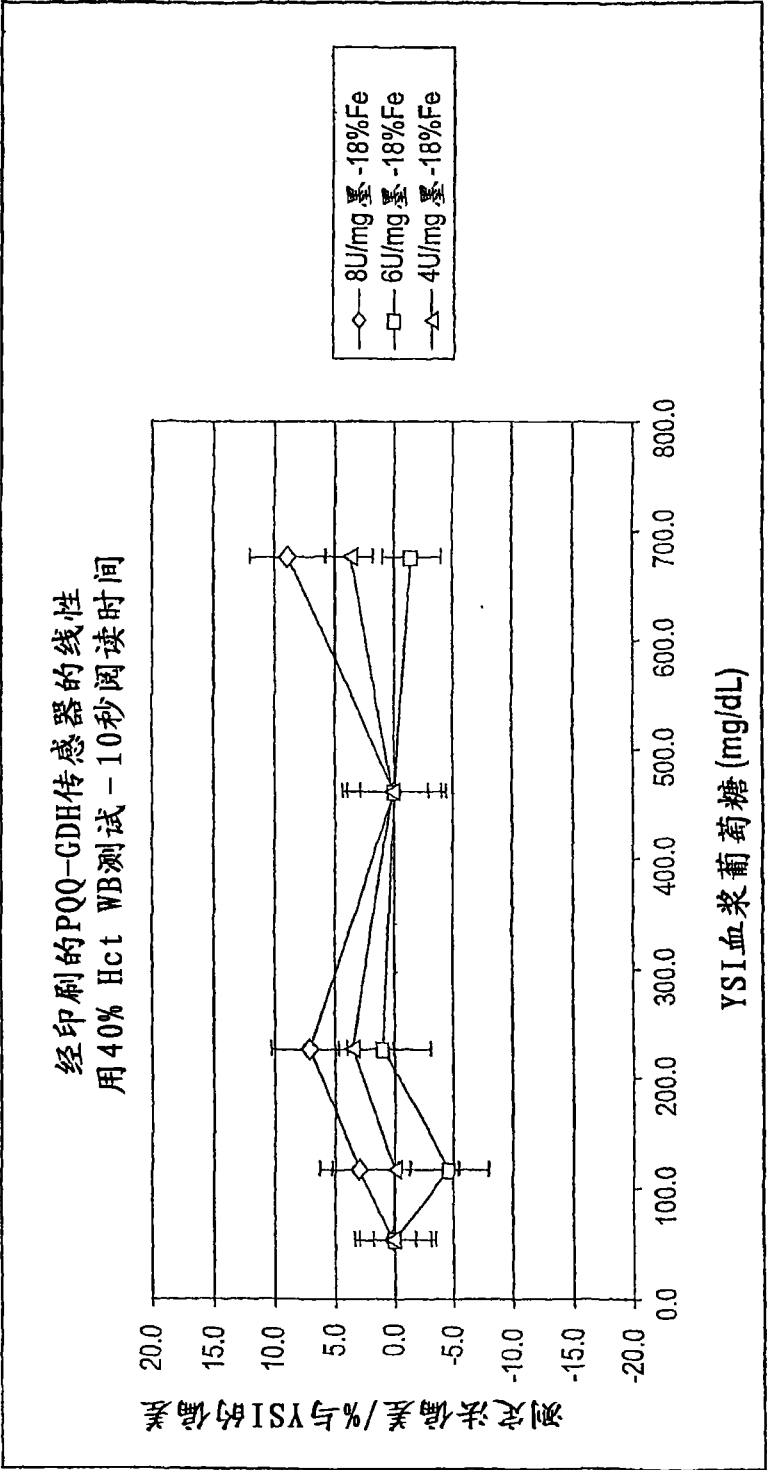


图6