

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 27/30

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00137769.8

[43] 公开日 2001 年 7 月 4 日

[11] 公开号 CN 1301963A

[22] 申请日 2000.12.27 [21] 申请号 00137769.8

[30] 优先权

[32] 1999.12.27 [33] JP [31] 369835/1999

[71] 申请人 松下电器产业株式会社

地址 日本国大阪府

[72] 发明人 谷池优子 池田信 南海史朗

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

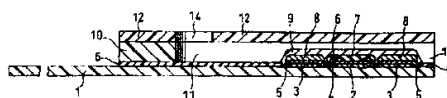
代理人 陈剑华

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图页数 7 页

[54] 发明名称 生物传感器

[57] 摘要

本发明提供一种电流响应特性保持至高浓度区域且空白响应低、保存稳定性好的生物传感器。该生物传感器具有包含与被供给的试液接触、构成电化学测定系的作用电极和反电极的电极系、支承上述电极系的绝缘性支承体、形成于上述作用电极上的第 1 试剂层、和形成于上述反电极上的第 2 试剂层,其中,所述第 1 试剂层的主要成分是酶,第 2 试剂层的主要成分是电子传递体。



ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 生物传感器，具有包含与被供给的试液接触、构成电化学测定系的作用电极和反电极的电极系、支承上述电极系的绝缘性支承体、形成于上述作用电极上的第1试剂层、和形成于上述反电极上的第2试剂层，所述第1试剂层不含酶，至少含有电子传递体，且所述第2试剂层不含电子传递体，至少含有酶。
2. 如权利要求1所述的生物传感器，其中，所述支承体由一个电绝缘性基板构成，在该基板上形成有所述作用电极和反电极。
3. 如权利要求1所述的生物传感器，其中，所述支承体由电绝缘性基板及在
10 与该基板之间形成试液供给通路的电绝缘性盖件构成，所述作用电极形成于所述基板上，所述反电极与所述作用电极对向地形成于所述盖件内表面上。
4. 如权利要求3所述的生物传感器，其中，所述盖件由用于在所述基板之间形成试液供给通路或试液收容部的、具有向外膨出的曲面部分的片材构成。
5. 如权利要求3所述的生物传感器，其中，所述盖件由具有形成所述试液供
15 给通路的隔板和覆盖所述隔板的盖板构成。
6. 如权利要求1所述的生物传感器，其中，第1试剂层含有亲水性高分子。



说明书

生物传感器

5 本发明涉及可对试样中的基质进行迅速而高精度的定量的生物传感器。

已开发的蔗糖、葡萄糖等糖类的定量分析法有使用施光度计法、比色法、还原滴定法和各种色谱法的方法等。但这些方法均由于对糖类的特异性不怎么高而精度低。在这些方法中，施光度计法虽然操作简便，但受操作时的温度的影响大。因此，施光度计法不适合作为一般家庭中使用的糖类定量方法。

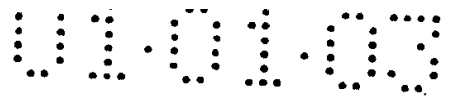
10 近年来，已开发出各种类型的利用酶的特异性催化作用的生物传感器。

下面，作为对试样中的基质进行定量的方法的一个例子，说明葡萄糖的定量方法。通常知道的电化学葡萄糖定量法有使用葡萄糖氧化酶（EC1.1.3.4，以下简称 GOD）和氧电极或过氧化氢电极的方法（例如，铃木周一编《生物传感器》讲谈社出版）。

15 GOD 以氧为电子传递体，选择性地作为基质的 β -D-葡萄糖氧化成 D-葡萄糖酸- δ -内酯。在氧的存在下通过 GOD 进行氧化反应的过程中，氧被还原成过氧化氢。利用氧电极，可测定氧的减少量，或者利用过氧化氢电极能够测定过氧化氢的增加量。由于氧的减少量及过氧化氢的增加量与试样中的葡萄糖含量呈正比，因此，根据氧的减少量或过氧化氢的增加量能够对葡萄糖进行定量。

20 在上述方法中，利用酶反应的特异性，可高精度地测定试样中的葡萄糖。但从反应过程也可推测，其欠缺点是测定结果受试样中所含氧浓度的影响大，如果试样中不含氧，则不能测定。

由此，人们开发出了不是以氧为电子传递体、而是以铁氰化钾、二茂铁衍生物、苯醌衍生物等有机化合物和金属配合物为电子传递体的新型葡萄糖传感器。
25 该类型的传感器使通过酶反应而产生的电子传递体的还原体在作用电极上氧化，通过氧化电流量求得试样中所含葡萄糖的浓度。此时，在反电极上，电子传递体的氧化体被还原，发生电子传递体的还原体的生成反应。用上述有机化合物和金属配合物代替氧作为电子传递体，可使已知量的 GOD 和它们的电子传递体在稳定的状态下正确地负载在电极上，形成试剂层，从而能不受试样中的氧浓度的影响、高精度地进行葡萄糖定量。此时，由于可使含有酶和电子传递体的试剂层在接近干燥的状态下与电极系形成一体，因此，以该技术为基础的一次性葡萄糖传感器近年来正倍受瞩目。其代表性例子有日本特许第 2517153 号公报中记载



的生物传感器。这种一次性葡萄糖传感器，只要在与测定器连接、但可离合的传感器中导入试样，就能够容易地用测定器测定葡萄糖的浓度。该方法不仅可进行葡萄糖定量，还可对试样中的其他基质进行定量。

5 近年来，人们期望有一种电流响应度更高的生物传感器和基准浓度为零时的响应（以下简称空白响应）低且保存稳定性优异的生物传感器。

本发明提供一种具有包含与被供给的试液接触、构成电化学测定系的作用电极和反电极的电极系、支承上述电极系的绝缘性支承体、形成于上述作用电极上的第1试剂层、和形成于上述反电极上的第2试剂层的生物传感器，其中，上述第1试剂层不含酶，至少含有电子传递体，且上述第2试剂层不含电子传递体，至少含有酶。

10 在一个较佳实施方式中，上述支承体由一个电绝缘性基板组成，该基板上形成有上述作用电极和反电极。

15 在另一个较佳实施方式中，上述支承体由电绝缘性基板及在与该基板之间形成试液供给通路的电绝缘性盖件构成，上述作用电极形成于上述基板上，上述反电极与上述作用电极对置，形成于上述盖件的内表面上。

较好的是，上述盖件由在与上述基板之间形成试液供给通路或试液收容部的具有向外膨出的曲面部分的片材构成。

更好的是，盖件由具有形成上述试液供给通路的隙缝的隔板和覆盖上述隔板的盖板构成。

20 第1试剂层最好含有亲水性高分子。

图1是本发明一实施例中的葡萄糖传感器的垂直剖面图。

图2是除去了试剂层和表面活性剂层的同一葡萄糖传感器的分解立体图。

图3是本发明另一实施例中的葡萄糖传感器的垂直剖面图。

25 图4是除去了试剂层和表面活性剂层的同一生物传感器的分解立体图。

图5是本发明又一实施例中的葡萄糖传感器的垂直剖面图。

图6是除去了试剂层和表面活性剂层的同一葡萄糖传感器的分解立体图。

图7是比较例中的葡萄糖传感器的垂直剖面图。

30 在本发明的一较佳实施方式中，生物传感器具有电绝缘性基板、形成于上述基板上的作用电极和反电极、形成于上述作用电极上的第1试剂层、和形成于上述反电极上的第2试剂层，第1试剂层不含酶，至少含有电子传递体，且上述第



2 试剂层不含电子传递体，至少含有酶。

该生物传感器由于作用电极上没有酶，因此，不会出现酶吸附在作用电极上而影响作用电极上的电极反应的情况，从而可使作用电极上的电子传递体的还原体的氧化反应顺利进行，提高电流响应度。此外，由于酶与电子传递体相互分离，因此，可防止酶与电子传递体接触而产生相互作用，抑制空白响应的增加，并可抑制长期保存过程中的酶活性的变动。

在本发明的另一较佳实施方式中，生物传感器具有电绝缘性基板、在与上述基板之间形成试液供给通路的电绝缘性盖件、形成于上述基板上的作用电极、与上述作用电极对置、形成于上述盖件内表面上的反电极、形成于上述作用电极上的第1试剂层、和形成于上述反电极上的第2试剂层，第1试剂层不含酶，至少含有电子传递体，且上述第2试剂层不含电子传递体，至少含有酶。

上述盖件由用于在与上述基板之间形成试液供给通路或试液收容部的、具有向外膨出的曲面部分的片材构成。

更好的是，盖件由具有形成上述试液供给通路的隙缝的隔板和覆盖上述隔板的盖板构成。

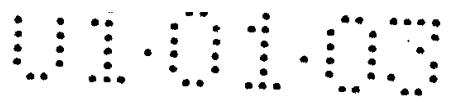
在此生物传感器中，由于第1试剂层和第2试剂层分别形成于不同的部件上，因此，可容易地形成互相分离的、组成互不相同的第1试剂层和第2试剂层。此外，由于作用电极和反电极形成于对向的位置上，因此，电极间的离子移动变得通顺，可进一步增加电流响应。

在盖件由隔板和盖板构成的生物传感器中，由于盖板的物理强度增加，因此，由外部的物理压力而引起的第1试剂层与第2试剂层的接触不会出现，从而可防止由酶与电子传递体的接触而导致的酶活性变动。

在上述任一实施方式的生物传感器中，较好的是，至少第1试剂层含有亲水性高分子。该亲水性高分子可抑制蛋白质等吸附在作用电极上，从而进一步提高电流响应感度。此外，测定时，溶解在试液中的亲水性高分子使试液的粘度增加，降低了对电流响应的物理冲击等，从而提高了电流响应的稳定性。

在本发明中，基板、隔板和盖板的材料只要具有电绝缘性、在保存和测定时具有充分的刚性即可。例如，可以是聚乙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚酰胺、饱和聚酯等热塑性树脂，脲树脂、三聚氰胺树脂、酚醛树脂、环氧树脂、不饱和聚酯树脂等热固性树脂。其中，从与电极的密合性的角度考虑，优选聚对苯二甲酸乙二酯。

作用电极的材料只要是将电子传递体氧化时其自身不被氧化的导电性材料即



可。反电极的材料可以是钨、银、铂、碳等通常使用的导电性材料。

所用的酶是与作为试样中所含测定对象的基质的对应物。其例子有果糖脱氢酶、葡萄糖氧化酶、醇氧化酶、乳酸氧化酶、胆固醇氧化酶、黄嘌呤氧化酶、氨基酸氧化酶等。

5 电子传递体的例子有铁氰化钾、对苯醌、N-甲基吩嗪鎓硫酸单甲酯盐、亚甲基蓝、二茂铁衍生物等。此外，以氧为电子传递体时，也可得到电流响应。上述电子传递体可单独使用，也可二种以上合用。

10 亲水性高分子可以是各种物质。例如可以是羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、乙基羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚赖氨酸等聚氨基酸、聚苯乙烯磺酸、明胶及其衍生物、聚丙烯酸及其盐、聚甲基丙烯酸及其盐、淀粉及其衍生物、马来酸酐或其盐的聚合物。其中，优选羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素。

下面通过实施例对本发明作更详细的说明。

15 实施例 1

作为生物传感器的一个例子，对葡萄糖传感器进行说明。

图 1 是本实施例的葡萄糖传感器的垂直剖面图，图 2 是除去了试剂层和表面活性剂层的同一葡萄糖传感器的分解立体图。

20 首先，用丝网印刷法将银膏印刷在电绝缘性的聚对苯二甲酸乙二醇酯基板 1 上，形成导线 2、3 和后述的电极的基底。然后，将含有树脂粘合剂的导电性碳糊印刷在基板 1 上，形成作用电极 4。该作用电极 4 与导线 2 接触。再在基板 1 上印刷绝缘性膏，形成绝缘层 6。绝缘层 6 覆盖作用电极 4 的外周部分，由此使作用电极 4 的露出部分的面积保持不变。接着，印刷含有树脂粘合剂的导电性碳糊，使其与导线 3 接触，形成反电极 5。

25 将含有电子传递体铁氰化钾、不含酶的第 1 水溶液滴在基板 1 的作用电极 4 上后干燥，形成第 1 试剂层 7。将含有酶 GOD、不含电子传递体的第 2 水溶液滴在基板 1 的反电极 5 上后干燥，形成第 2 试剂层 8。为了能顺利地供给试样，形成含有表面活性剂卵磷脂的层 9，使其覆盖第 1 试剂层 7 和第 2 试剂层 8。

30 最后，按图 2 中点划线所示位置关系，将基板 1、盖板 12 和间隔件 10 连接，制作葡萄糖传感器。

夹在基板 1 和盖板 12 之间的间隔件 10 具有隙缝 11，该隙缝 11 在基板 1 与盖板 12 之间形成试液供给通路。



盖板 12 的空气孔 14 与该试液供给通路连通，因此，若使试样与形成于隙缝 11 的开放端的试样供给口 13 接触，则由于毛细管现象，试样可容易地到达在试液供给通路内的第 1 试剂层 7 和第 2 试剂层 8。

5 作为比较例，除了形成试剂层的步骤不同之外，按与本实施例相同的方法制作葡萄糖传感器。图 7 是比较例的葡萄糖传感器的垂直剖面图。试剂层 31 通过将含有 GOD 和铁氰化钾的水溶液滴在作用电极 4 和反电极 5 上后干燥而形成。再在试剂层 31 上形成含有表面活性剂卵磷脂的层 9。

10 下面，以含有一定量葡萄糖的溶液为试样，用实施例 1 和比较例的葡萄糖传感器测定葡萄糖浓度。将试样从试样供给口 13 供给至试样供给通路，经过一定时间后，以反电极 5 为基准，在作用电极 4 上施加 500mV 电压。在盖板 12 与基板 1 之间插入间隔件 10，增加传感器抵抗物理压力的强度。这样，可容易地使试液供给通路的容积保持不变，减少物理压力等对电流响应的影响。

15 通过上述施加电压，测定在作用电极 4 与反电极 5 之间流过的电流值，结果，在实施例 1 和比较例中，均观察到与试样中的葡萄糖浓度成比例的电流响应。当试样与第 1 试剂层 7 接触时，氧化型的电子传递体铁氰化钾离解成铁氰化物离子和钾离子。试样中的葡萄糖与从第 1 试剂层 7 溶解至试样中的铁氰化物离子和从第 2 试剂层 8 溶解至试样中的 GOD 反应。结果，葡萄糖被氧化成葡糖酸内酯，氧化型的铁氰化物离子被还原成还原型的亚铁氰化物离子。在作用电极 4 上发生亚铁氰化物离子被氧化成铁氰化物离子的反应，在反电极 5 上发生铁氰化物离子被还原成亚铁氰化物离子的反应。由于亚铁氰化物离子的浓度与葡萄糖浓度成一定比例，因此，根据亚铁氰化物离子的氧化电流，可测定葡萄糖浓度。

20 与作用电极 4 上的试剂层 31 中含有酶 GOD 的比较例的葡萄糖传感器相比，实施例 1 的葡萄糖传感器的电流响应增加。这是因为第 1 试剂层 7 中不含 GOD，从而可防止 GOD 吸附在作用电极 4 上而导致电流响应下降。

25 此外，与比较例相比，空白响应下降，长期保存之前和之后的电流响应的变动被抑制。这是因为 GOD 与铁氰化钾互相分离，从而可防止两者接触而互相作用，抑制空白响应的增加和长期保存过程中的酶活性的变动。

实施例 2

30 图 3 是本实施例中的葡萄糖传感器的垂直剖面图，图 4 是除去了试剂层和表面活性剂层的同一葡萄糖传感器的分解立体图。

将钯溅镀在电绝缘性基板 21 上，形成作用电极 4 和导线 2。然后，将绝缘片

23 贴附在基板 21 上，将作用电极 4 和插入于测定器中的端子部固定。

另一方面，在具有向外膨出的曲面部分 24 的电绝缘性盖件 22 的曲面部分 24 的内壁面上溅镀钯，形成反电极 5。曲面部分 24 的端部有空气孔 14。

5 第 1 试剂层 7 通过将含有电子传递体铁氰化钾、不含酶的第 1 水溶液滴在基板 21 的作用电极 4 上后干燥而形成。第 2 试剂层 8 通过将含有酶 GOD、不含电子传递体的第 2 水溶液滴在盖件 22 的反电极 5 上后干燥而形成。再在第 1 试剂层 7 上形成含有表面活性剂卵磷脂的层 9。

10 最后，将基板 21 与盖件 22 贴合，制作葡萄糖传感器。这样，作用电极 4 与反电极 5 以形成于基板 21 与盖件的曲面部分 24 之间的空间部分为中介，配置在对向的位置上。该空间部分成为试样的收容部分，若使试样与空间部分的开放端侧接触，则由于毛细管现象，试样容易地向空气孔 14 侧移动，与第 1 试剂层 7 和第 2 试剂层 8 接触。

15 接着，按与实施例 1 相同的步骤测定葡萄糖浓度。其结果，观察到与试样中的葡萄糖浓度成比例的电流响应。但对于反电极 5，用夹钳将曲面部分 24 的端部夹住等而实现电导通。

与实施例 1 相比，观察到实施例 2 的葡萄糖传感器的响应值进一步增加。这是因为与实施例 1 同样，第 1 试剂层 7 不含 GOD，并将作用电极 4 和反电极 5 配置在对向的位置上，使得电极间的离子移动变得通顺。

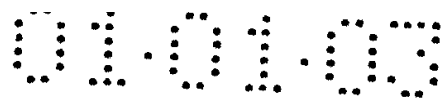
20 此外，由于 GOD 和铁氰化钾互相分离，因此，与实施例 1 同样，与比较例相比，空白响应下降，长期保存之前和之后的电流响应的变动被抑制。

实施例 3

图 5 是本实施例的葡萄糖传感器的垂直剖面图。图 6 是除去了试剂层和表面活性剂层的同一葡萄糖传感器的分解立体图。

25 首先，用丝网印刷法将银膏印刷在电绝缘性的聚对苯二甲酸乙二醇酯基板 31 上，形成导线 2。然后，将含有树脂粘合剂的导电性碳糊印刷在基板 31 上，形成作用电极 4。该作用电极 4 与导线 2 接触。再在基板 31 上印刷绝缘性膏，形成绝缘层 6。绝缘层 6 覆盖作用电极 4 的外周部分，由此使作用电极 4 的露出部分的面积保持不变。

30 接着，在电绝缘性盖板 32 的背面印刷银膏，形成导线 3，然后，印刷导电性碳糊，形成反电极 5，再印刷绝缘性膏，形成绝缘层 6。在盖板 32 上形成有空气孔 14。



将含有电子传递体铁氰化钾、不含酶的第 1 水溶液滴在基板 31 的作用电极 4 上后干燥，形成第 1 试剂层 7。将含有酶 GOD、不含电子传递体的第 2 水溶液滴在盖板 32 的反电极 5 上后干燥，形成第 2 试剂层 8。再在第 1 试剂层 7 上形成含有表面活性剂卵磷脂的层 9。

5 最后，按图 6 中点划线所示位置关系，将基板 31、盖板 32 和间隔件 10 连接，制作葡萄糖传感器。

夹在基板 31 和盖板 32 之间的间隔件 10 具有隙缝 11，该隙缝 11 在基板 31 与盖板 32 之间形成试液供给通路。作用电极 4 和反电极 5 被对置在形成于间隔件 10 的隙缝 11 部分的试液供给通路内。

10 盖板 32 的空气孔 14 与该试液供给通路连通，因此，若使试样与形成于隙缝 11 的开放端的试样供给口 13 接触，则由于毛细管现象，试样可容易地到达在试液供给通路内的第 1 试剂层 7 和第 2 试剂层 8。

接着，按与实施例 1 相同的步骤测定葡萄糖。其结果，观察到与试样中的葡萄糖浓度成比例的电流响应。

15 由于实施例 3 的葡萄糖传感器的第 1 试剂层 7 不含 GOD 且作用电极 4 和反电极 5 被配置在对向的位置上，因此，与实施例 2 同样，与实施例 1 相比，电流响应增加。

此外，由于 GOD 和铁氰化钾互相分离，因此，与实施例 1 同样，与比较例相比，空白响应下降，长期保存之前和之后的电流响应的变动被抑制。

20 另外，由于在基板 31 与盖板 32 之间夹入了间隔件 10，增加了盖板 32 抵抗物理压力的强度，不会出现第 1 试剂层 7 与第 2 试剂层 8 由于物理压力而接触的情况，从而可避免 GOD 与铁氰化钾接触而引起酶活性变动并导致电流响应变动。此外，由于可容易地使试液供给通路的容积保持不变，因此，与实施例 2 相比，电流响应的稳定性提高。

25

实施例 4

在本实施例中，除了形成第 1 试剂层 7 和第 2 试剂层 8 的步骤之外，按与实施例 3 相同的制作方法制作葡萄糖传感器。

30 第 1 试剂层 7 通过将含有电子传递体铁氰化钾和亲水性高分子羧甲基纤维素、不含酶的第 1 水溶液滴在基板 31 的作用电极 4 上后干燥而形成。第 2 试剂层 8 通过将含有酶 GOD 和羧甲基纤维素、不含电子传递体的第 2 水溶液滴在盖板 32 的反电极 5 上后干燥而形成。再在第 1 试剂层 7 上形成含有表面活性剂卵

磷脂的层 9。

接着，按与实施例 1 相同的步骤测定葡萄糖。其结果，观察到与试样中的葡萄糖浓度成比例的电流响应。

5 由于本实施例的葡萄糖传感器的第 1 试剂层 7 不含 GOD 且作用电极 4 和反电极 5 被配置在对向的位置上，因此，与实施例 2 同样，与实施例 1 相比，电流响应增加。

此外，由于 GOD 和铁氰化钾互相分离，因此，与实施例 1 同样，与比较例相比，空白响应下降，长期保存之前和之后的电流响应的变动被抑制。

10 另外，由于在基板 31 与盖板 32 之间夹入了间隔件 10，因此，与实施例 3 同样，不会出现 GOD 与铁氰化钾接触、使得酶活性变动而导致电流响应变动的情况。此外，由于可容易地使试液供给通路的容积保持不变，因此，与实施例 3 同样，与实施例 2 相比，电流响应的稳定性提高。

15 此外，与实施例 2 和 3 相比，还出现电流响应增加。这是因为羧甲基纤维素在第 1 试剂层 7 中的存在，使得蛋白质等不会吸附在作用电极 4 的表面，作用电极 4 上的电极反应得以顺利进行。另外，由于测定时试样粘性增加，降低了物理冲击等对传感器的影响，使传感器响应的变动减小。

在以上实施例中，以反电极 5 为基准，施加在作用电极 4 上的电压为 500mV，但本发明不限于此数值，只要是该电压能使伴随酶反应而被还原的电子传递体氧化即可。

20 在上述实施例中，第 1 试剂层 7 含有一种电子传递体，但也可含有二种以上的电子传递体。

通过将第 1 试剂层 7 和第 2 试剂层 8 固定在作用电极 4 或反电极 5 上，可使酶或电子传递体不会被溶化。固定时，最好使用交联固定法或吸附法。此外，也可将酶或电子传递体混合在电极材料中。

25 表面活性剂可以是卵磷脂以外的物质。此外，在上述实施例中，仅在第 1 试剂层 7 上，或者在第 1 试剂层 7 和第 2 试剂层 8 上形成表面活性剂层 9，但本发明不限于这些情形，也可在在间隔件 10 的隙缝 11 的侧面等面对试样供给通路的位置形成表面活性剂层 9。

30 在上述实施例中，就仅作用电极和反电极的二电极系进行了描述，若改成添加了参比电极的三电极系，则可更正确地进行测定。

第 1 试剂层 7 和第 2 试剂层 8 最好互相不接触、用空间部分将两者隔开。这样，可抑制空白响应的增加并可更大幅度地提高保存稳定性。

010103

如上所述，根据本发明，可得到电流响应感度高且空白响应低、保存稳定性好的生物传感器。

说明书附图

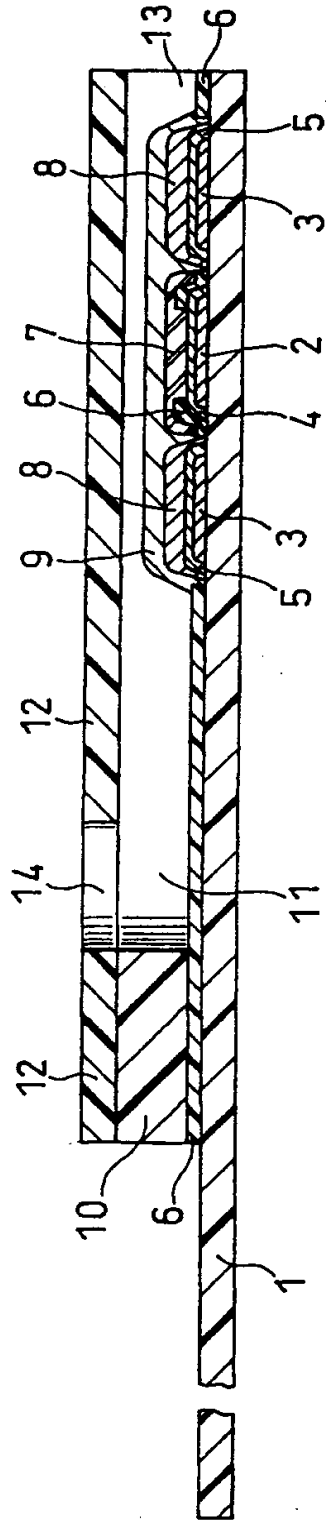


图 1

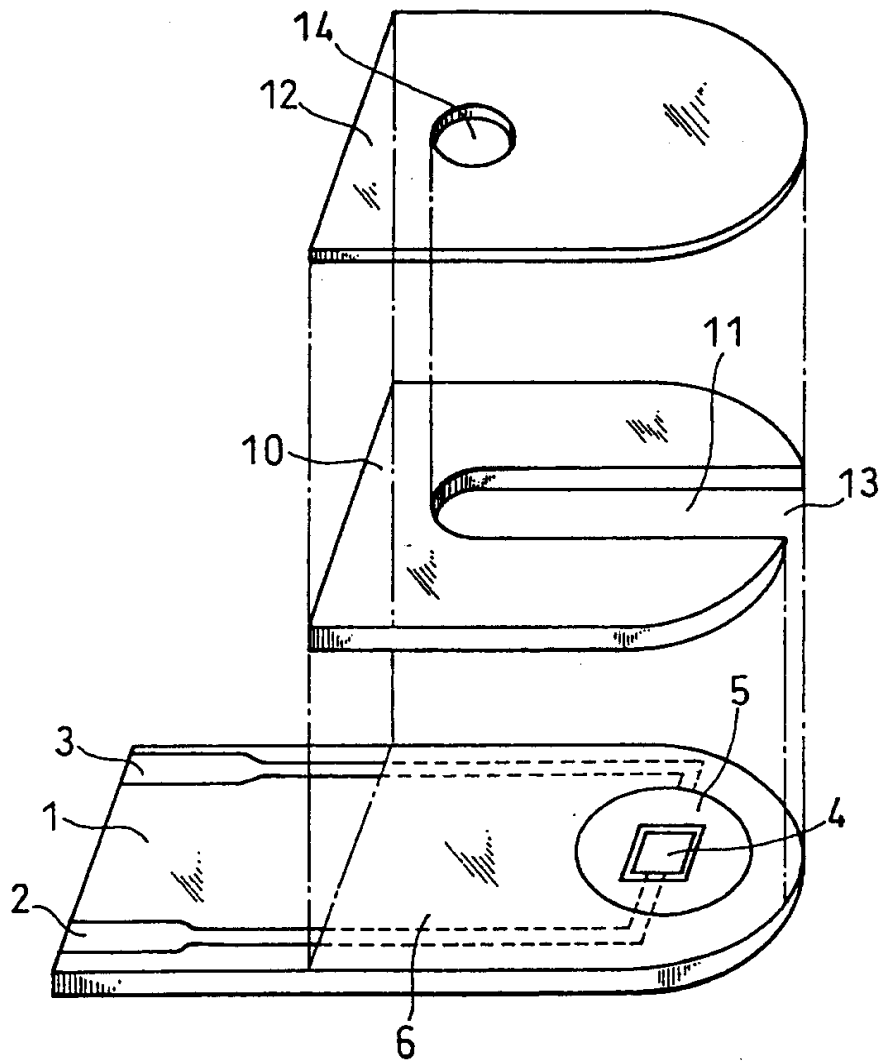
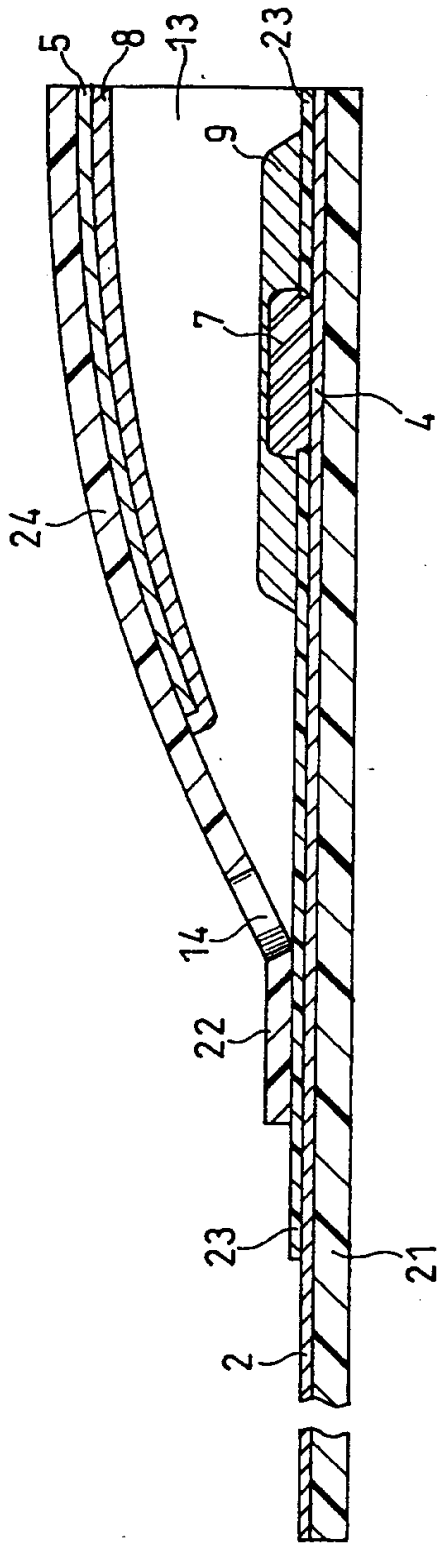


图 2



3

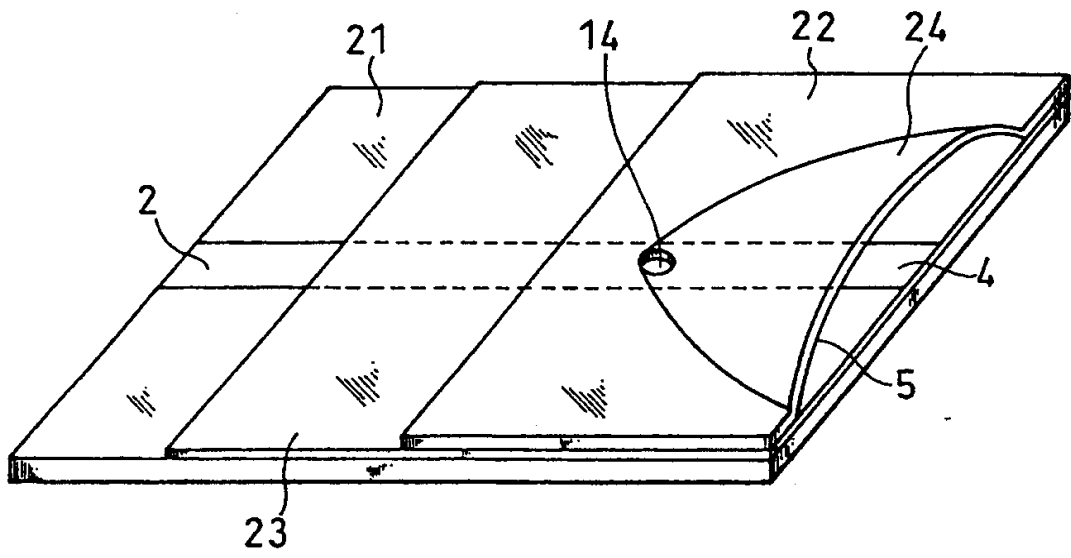
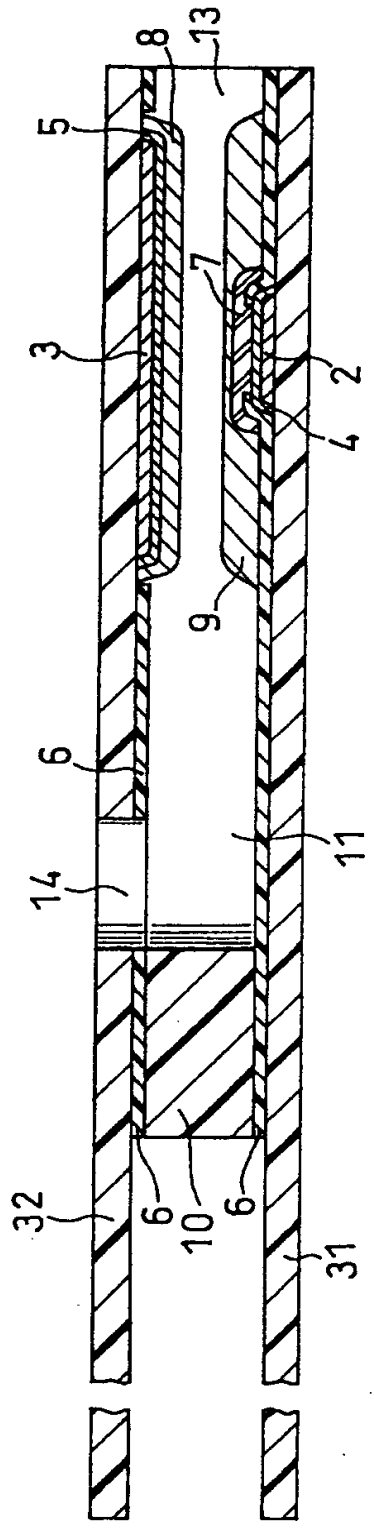


图 4



5

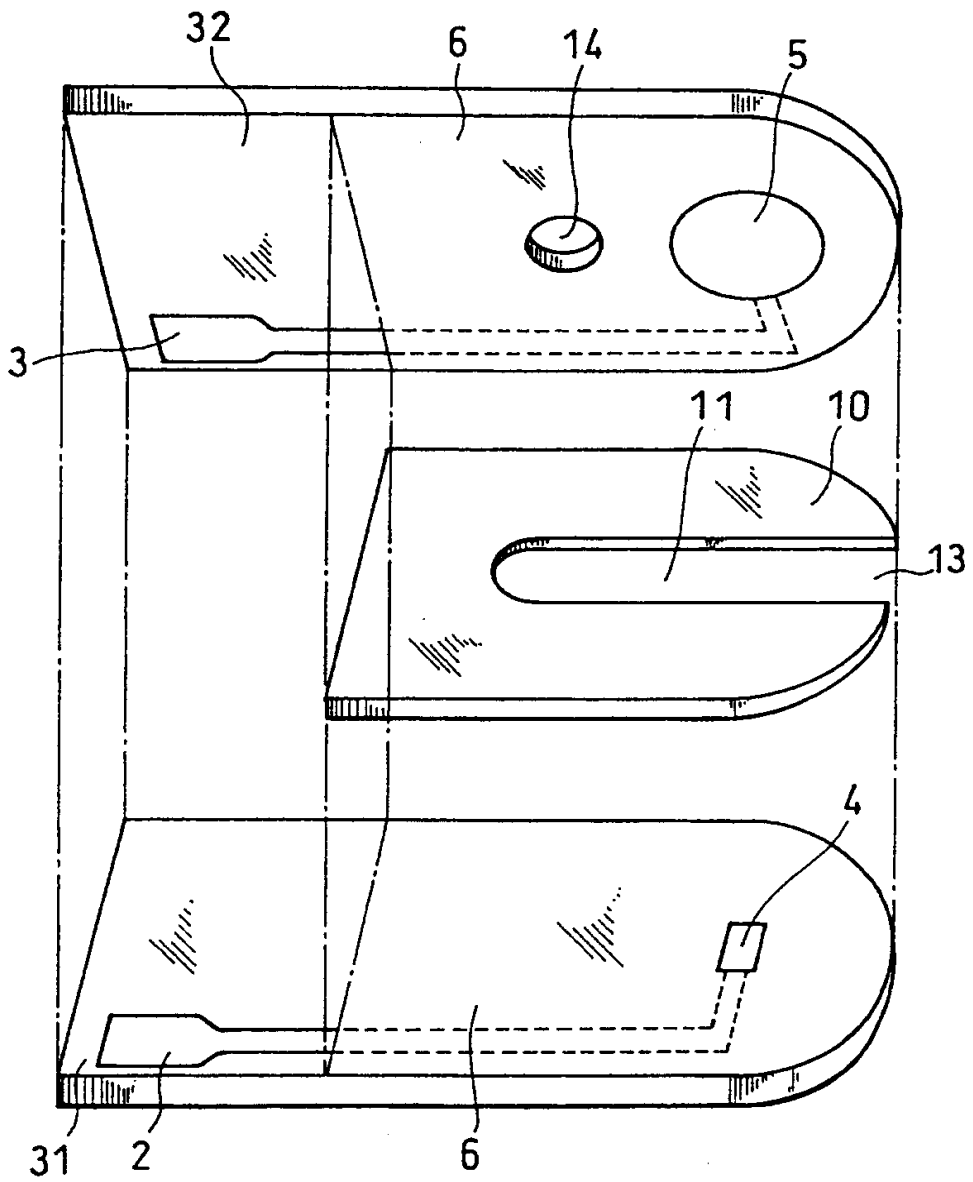


图 6

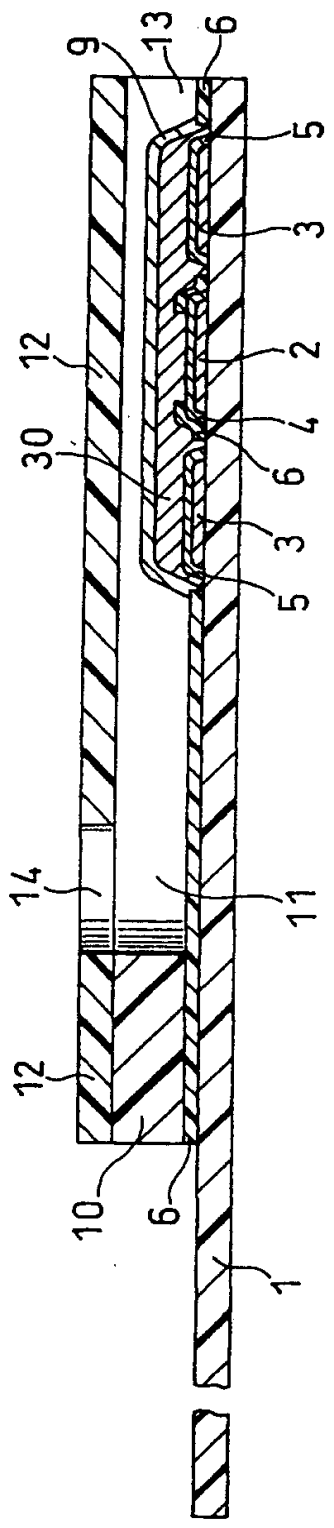


图 7