

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01802234.0

[43] 公开日 2002 年 12 月 18 日

[11] 公开号 CN 1386194A

[22] 申请日 2001.7.26 [21] 申请号 01802234.0

[30] 优先权

[32]2000.7.31 [33]JP [31]232385/00

[86] 国际申请 PCT/JP01/06472 2001.7.26

[87] 国际公布 WO02/10735 日 2002.2.7

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.28

[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 山本智浩 长谷川美和 渡边基一

池田信

南海史朗

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

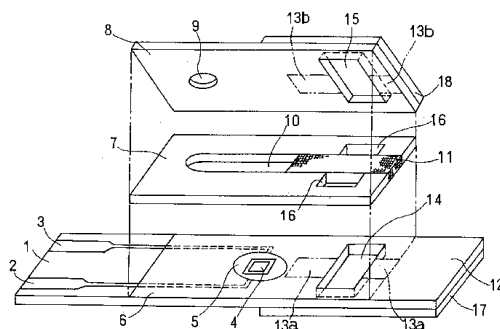
代理人 陈剑华

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 9 页

[54] 发明名称 生物传感器

[57] 摘要

本发明提供了即使对含有血细胞等固形成分的试样溶液也能够进行高精度测定、且感应值的稳定性良好的生物传感器。该生物传感器具备绝缘性基板、设置在前述基板上的至少具有工作电极和配极的电极系、与前述基板组合形成将试样溶液从试样供给部位导向前述电极系的试样溶液供给通道的覆盖部件、至少包含氧化还原酶和导电体的反应试剂系统、设置在前述试样溶液供给通道的电极系和试样供给部位间的滤膜,从前述滤膜的试样供给部位的端部到电极系的端部的区域内具有包围滤膜表面的空隙部分。利用上述构造使血细胞等固形成分被滤膜过滤而不流入电极系。



1. 生物传感器，具备绝缘性基板、设置在前述基板上的至少具有工作电极和配极的电极系、与前述基板组合形成将试样溶液从试样供给部位导向前述
5 电极系的试样溶液供给通道的覆盖部件、至少包含氧化还原酶和导电体的反应试剂系统、设置在前述试样溶液供给通道的电极系和试样供给部位间的滤膜，其特征在于，从前述滤膜的试样供给部位的端部到电极系的端部的区域内具有包围滤膜表面的空隙部分。

2. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中，前述覆盖部件被设置在前述
10 基板的上方，前述试样溶液供给通道从设置在前述基板上的试样供给部位开始沿前述覆盖部件及基板配置。

3. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中，前述试样供给部位位于前述电极系的一侧。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的生物传感器，其中，前述空隙部分的宽度为
15 0.5mm~5.0mm。

5. 如权利要求 4 所述的生物传感器，其中，前述空隙部分的宽度为 1.0mm~3.0mm。

6. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中，前述试样溶液供给通道从设置于前述覆盖部件的试样供给部位开始沿重力方向配置。

7. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中，前述试样供给部位位于前述
20 电极系的上方。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的生物传感器，其中，前述空隙部分的宽度在 100 μm 以上，但小于前述滤膜的厚度。

9. 如权利要求 5 或 8 所述的生物传感器，其中，前述滤膜由具备三维相
25 连的空隙部分的多孔体形成，所述多孔体利用毛细管作用将血液从前述试样供给部位导向试样溶液供给通道，具有利用血浆与血细胞的流动阻力差来过滤血细胞的作用。

10. 如权利要求 9 所述的生物传感器，其中，前述氧化还原酶为胆甾醇氧化酶。

11. 如权利要求 10 所述的生物传感器，其中，前述反应试剂系统中包含
30 可使胆甾醇酯水解的酶。

12. 如权利要求 11 所述的生物传感器，其中，前述可使胆甾醇酯水解的酶为胆甾醇酯酶。

13. 如权利要求 11 或 12 所述的生物传感器，其中，前述反应试剂系统中包含表面活性剂。

5 14. 如权利要求 13 所述的生物传感器，其中，前述覆盖部件及前述绝缘性基板的一部分或全部是透明的。

生物传感器

5 技术领域

本发明涉及能够迅速且简便地对试样中的测定对象进行高精度定量的生物传感器。

背景技术

10 以往，作为不用对试样溶液进行稀释和搅拌等处理就能够对试样中的特定成分进行定量的方法，揭示了以下所述的生物传感器(日本专利公开公报平 2-062952 号)。

该生物传感器的绝缘性基板上通过丝网印刷等方法形成了由测定电极、工作电极、配极及参考电极组成的电极系，该电极系上则形成了包含亲水性高分子、氧化还原酶及导电体的酶反应层。根据需要可在该酶反应层中添加缓冲剂。

如果在以上制得的生物传感器的酶反应层上滴加含有底物的试样溶液，则酶反应层溶解，酶与底物反应，导电体随之还原。酶反应结束后，该被还原的导电体又通过电化学方法氧化，由此时获得的氧化电流值可求得试样溶液中的底物浓度。

上述生物传感器的原理是以测定对象物质为底物，通过对酶进行选择对各种不同的物质进行测定。例如，如果使用葡萄糖氧化酶为氧化还原酶，则能够构成可对血液中的葡萄糖浓度进行测定的生物传感器。该传感器作为葡萄糖传感器被广泛使用。此外，如果使用胆甾醇氧化酶，则能够构成可对血清中的胆甾醇进行测定的生物传感器。

通常，作为诊断基准使用的血清胆甾醇值是胆甾醇和胆甾醇酯的浓度合计值。胆甾醇酯不会成为因胆甾醇氧化酶而进行的氧化反应的底物。因此，要对作为诊断基准的血清胆甾醇值进行测定，就必须有使胆甾醇酯转变为胆甾醇的过程。该过程中以胆甾醇酯酶作为催化剂。

30 使用酶反应层中包含胆甾醇酯酶和胆甾醇氧化酶的生物传感器，可测定血清中的总胆甾醇浓度。

但是，在进行胆甾醇的测定时会受到细胞膜中存在的胆甾醇的影响。此外，反应试剂中的胆甾醇酯酶最好与可提高反应性的表面活性剂共存。在大多数情况下，由于表面活性剂会破坏细胞膜，所以细胞内的物质可能会直接或间接地对酶反应或电极产生影响。基于此，胆甾醇传感器的酶反应及其后的电极反应都最好在血浆或血清中进行。除了胆甾醇传感器之外，有时血液中血细胞的存在会对感应值产生影响，理想的情况是在不含血细胞的溶液中进行酶反应和电极反应。

从全血中分离出血浆或血清时一般采用离心分离的方法。但是，进行离心分离需要时间，且操作复杂。

10 美国专利第 3,607,092 号揭示了血液试验中的膜片。该膜片具有可使溶液透过但无法使血细胞等固体和蛋白质等大分子透过的薄膜层，因此，利用该薄膜可除去血细胞。但是，随着血液的透过薄膜上蓄积了大量固体成分，所以为了获得上述生物传感器的反应所必须的滤液，需要面积更大的薄膜层。因此，前述薄膜并不一定适用。

15 美国专利第 4,477,575 号揭示了利用玻璃纤维滤膜使全血通过以分离出血清的装置及方法。这种利用纤维和多孔体形成的滤膜从全血中分离出血清的方法可能适用于上述生物传感器。但是，该方法中的滤膜并不能够阻挡血细胞，只能够简单地减慢其流速，实际上只完成了血细胞和血浆的分离。因此，为了使该方法适用于上述生物传感器，在血细胞未从滤膜流出的过程中必须获得生物传感器的反应所必须的量以上的通过滤膜过滤的血浆或血清。这样就必须使滤膜的血液流动方向的长度的设定满足上述条件。

20 将满足上述条件的滤膜设置在生物传感器的配置了电极系及反应试剂系统的部位及供给作为试样的血液的部位之间，就能够构成具有血细胞过滤能力的生物传感器。图 9 所示即为该传感器的一个例子，图 9 为除去了反应试剂层的分解立体图。

25 图 9 中，在由聚对苯二甲酸乙二醇酯形成的绝缘性基板 101 上通过丝网印刷法涂布银糊，形成导电片 102 和 103 及电极系的底层。然后，在基板 101 上涂布含有树脂粘合剂的导电性碳糊形成包括工作电极 104 和配极 105 的电极系。此外，通过涂布绝缘糊形成绝缘层 106。工作电极 104 和配极 105 分别与导电片 102 和导电片 103 相连。工作电极 104 及配极 105 的露出部分面积一定，且绝缘层 106 覆盖部分导电片。

以上形成了电极系的绝缘性基板 101、具有气孔 109 的罩子 108、隔板 107 及具有血细胞过滤功能的滤膜 111 按照图中点划线所示的位置关系相连形成生物传感器。滤膜 111 嵌合在罩子 108 和绝缘性基板 101 间由隔板 107 的狭缝 110 形成的试样溶液供给通道中。113a 表示滤膜 111 的与绝缘性基板接触的部分。

5 滤膜 111 不覆盖前述试样溶液通道中的由工作电极 104 和配极 105 形成的电极系，而是被设置在电极系和基板上的试样供给部位 112 间。

在以上构成的生物传感器的试样供给部位 112 滴下血液，血液从滤膜 111 的试样供给部位的端部渗入其内部。由于滤膜内血细胞的渗透速度比作为液体成分的血浆慢，所以血浆从滤膜的电极系端部渗出。渗出的血浆一边使位于覆盖电极的位置或其上的罩子内面的由酶等组成的反应试剂溶解，一边填满到气孔 109 为止的整个试样溶液供给通道。当整个试样溶液供给通道被液体填满后，滤膜 111 内的液体也停止流动，此时血细胞未到达滤膜的电极系端部，而是停留在原来的位置。

10

这样经过血细胞的过滤，血浆溶解的反应试剂层与血浆中的测定成分发生化学反应，如果是胆甾醇传感器就与胆甾醇发生化学反应，经过一定时间后，利用电极反应测定电流值，再由此测定血浆中的成分。

15

但是，在该生物传感器的试样供给部位 112 滴下的血液的一部分未被滤膜 111 的试样供给部位端部吸收，而是被转移到试样溶液供给通道和滤膜 111 的接触部位，这样包含血细胞成分的血液直接到达反应试剂层，其结果是，血细胞或血细胞内的成分与反应试剂发生反应，使测定值出现误差。

20

用粘合剂粘合滤膜 111 和试样溶液供给通道的接触部分可防止以上血液被转移到滤膜 111 和试样溶液供给通道的间隙的现象。

但是，所用粘合剂可能会改变血液成分。此外，滤膜 111 表面或试样溶液供给通道的接触部位需要涂布粘合剂，这样制作工序就会变得复杂。

25 本发明的目的是对具备可使血细胞等固形成分过滤的滤膜的生物传感器进行改进，解决以往技术中存在的上述问题。

本发明的目的是使传感器中添加的试样渗透入滤膜内，但仅使透过滤膜的试样溶液到达反应试剂层及电极系，以此提供能够显现稳定的感应性的生物传感器。

发明的揭示

本发明的生物传感器具备绝缘性基板、设置在前述基板上的至少具有工作电极和配极的电极系、与前述基板组合形成将试样溶液从试样供给部位导向前述电极系的试样溶液供给通道的覆盖部件、至少包含氧化还原酶和导电体的反应试剂系统、设置在上述试样溶液供给通道的电极系和试样供给部位间的滤膜，该生物传感器的特征是，从前述滤膜的试样供给部位的端部到电极系的端部的区域内具有包围滤膜表面的空隙部分。

较好的实施方式中，前述试样供给部位被设置在前述基板上，前述试样溶液供给通道沿基板及覆盖部件配置。

10 该实施方式中，包围前述滤膜表面的空隙部分宽度最好在 0.5mm 以上。前述空隙部分宽度如果小于 0.5mm，则转移到形成试样溶液供给通道的基板及/或覆盖部件和滤膜的间隙的血液可能会因毛细管作用进入空隙部分。更好的是空隙部分宽度在 0.5mm~5.0mm 的范围内。如果超过 5.0mm，则使传感器振动的情况下滤膜可能会变形。前述空隙部分宽度最好在 1.0mm~3.0mm 的范围内。

15 其他较好的实施方式中，前述试样供给部位被设置于前述覆盖部件，前述试样溶液供给通道从试样供给部位开始沿重力方向配置。该实施方式中，包围滤膜表面的空隙部分的宽度最好在 100 μ m 以上，小于前述滤膜的厚度。

所用滤膜由具备三维相连的空隙部分的多孔体形成，该多孔体通过毛细管作用将血液从前述试样供给部位转移到试样溶液供给通道，并具备利用血浆和血细胞的流动阻力差对血细胞进行过滤的作用。该滤膜可采用玻璃纤维、纤维素、纸浆等亲水性纤维形成的非织造布、滤纸及其他多孔体。

本发明适用于以胆甾醇氧化酶为氧化还原酶的胆甾醇传感器。

胆甾醇传感器的前述反应试剂系统中最好包含能够对胆甾醇酯进行分解的酶。这种能够对胆甾醇酯进行水解的酶最好为胆甾醇酯酶，前述反应试剂系
25 统中最好还包含表面活性剂。

前述覆盖部件及前述绝缘性基板的部分或全部最好是透明的。

对附图的简单说明

30 图 1 为本发明实施方式之一的生物传感器的除去了反应试剂的分解立体图。

图 2 为同一生物传感器的纵截面图。

图 3 为本发明另一实施方式中的生物传感器的主要部分的平面图。

图 4 为本发明另一实施方式中的生物传感器的纵截面图。

图 5 为本发明又一实施方式中的生物传感器的纵截面图。

图 6 为同一传感器的分解立体图。

5 图 7 为本发明另一实施方式中的生物传感器的纵截面图。

图 8 为同一生物传感器的分解立体图。

图 9 为已有技术中的生物传感器除去了反应试剂层的分解立体图。

实施发明的最佳方式

10 如上所述，本发明的生物传感器的基板和覆盖部件间形成的试样溶液供给通道中具备设置在基板或覆盖部件侧的试样供给部位和基板上的电极系间的滤膜。从前述滤膜的试样供给部位的端部到电极系的端部的区域内具有包围滤膜表面的空隙部分。即，滤膜表面的周围设置了不与形成试样溶液供给通道的基板及覆盖部件接触的区域。

15 从某种角度看，本发明的生物传感器具备绝缘性基板、设置在前述基板上的至少具有工作电极和配极的电极系、与前述基板组合形成将试样溶液从基板上的试样供给部位导向前述电极系的试样溶液供给通道的覆盖部件、至少包含氧化还原酶和导电体的设置在前述电极系上或其附近的反应试剂系统、设置在前述试样溶液供给通道的电极系和试样供给部位间的滤膜，从前述滤膜的试样供给部位的端部到电极系的端部的区域内具有包围滤膜表面的空隙部分。

20 从另一角度看，本发明的生物传感器具备绝缘性基板、设置在前述基板上的至少具有工作电极和配极的电极系、与前述基板组合的覆盖部件、形成于前述覆盖部件和基板间的将试样溶液从前述覆盖部件的试样供给部位导向基板上的电极系的试样溶液供给通道、至少包含氧化还原酶和导电体的设置在前述电极系上或其附近的反应试剂系统、设置在前述试样溶液供给通道的电极系和试样供给部位间的滤膜，从前述滤膜的试样供给部位的端部到电极系的端部的区域内具有包围滤膜表面的空隙部分。

上述构造使滴在试样供给部位的血液等试样溶液被前述滤膜吸收，血细胞等固形成分则被前述滤膜过滤，将试样溶液沿试样溶液供给通道导向电极系及反应试剂层。其结果是，仅血细胞等固形成分被过滤了的试样溶液到达了电极系。在试样溶液供给通道的试样供给部位附近，有时部分试样溶液不是被滤膜

吸收，而是从滤膜和试样溶液供给通道的接触部分的细小缝隙直接流入试样溶液供给通道内。但是，这部分试样溶液在包围前述滤膜表面的空隙部分被阻挡，不能够进入其上的电极系。因此，含有血细胞等固形成分的试样溶液不会从设有空隙部分的区域流向电极系。在试样溶液供给通道中，反应试剂层最好

5 设置在电极系上或其附近。

构成反应试剂系统的氧化还原酶可采用各种不同的酶，例如，葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、胆甾醇氧化酶等。

测定血清胆甾醇值时，采用胆甾醇氧化酶和能够使胆甾醇酯水解的酶。可使胆甾醇酯水解的酶包括胆甾醇酯酶和脂蛋白脂肪酶等。特别是胆甾醇酯酶，

10 在使用了适当的表面活性剂的情况下，可迅速将胆甾醇酯转变为胆甾醇。

使用可使胆甾醇酯水解的酶时，如果使反应试剂中包含可提高酶活性的表面活性剂，则可大大缩短酶反应所需时间。

例如，可使胆甾醇酯酶的活性得到提高的表面活性剂包括正辛基- β -D-一硫葡萄糖苷、聚乙二醇一月桂醚、胆酸钠、月桂基- β -麦芽糖苷、蔗糖-一月桂酸酯、脱氧胆酸钠、牛磺脱氧胆酸钠、N,N-二(3-D-葡萄糖酰胺丙基)乙醇酰胺、N,N-二(3-D-葡萄糖酰胺丙基)脱氧乙醇酰胺、聚氧化乙烯-对叔辛基苯基乙醚(TritonX-100)等。

15

如果用铂等电化学特性稳定的金属形成生物传感器的电极系，则所得氧化电流值不会出现误差。但是，这类金属的价格较高，所以制作一次性传感器时，

20 用银糊等形成银电极，再用碳糊覆盖该银电极而形成碳电极，由该银·碳电极形成电极系。如果试样溶液中包含表面活性剂，则试样溶液因表面活性剂的作用而浸入碳粒间。其结果是，碳电极的活性下降。此外，试样溶液处于与银电极接触的状态。因此，在这种状态下如果对工作电极施加电压，则银电极会发生银糊反应产生电流，使测定电流值出现正误差。

25 为了抑制上述现象，采取用亲水性高分子覆盖电极系表面的方法。该亲水性高分子可抑制因试样溶液的导入而形成粘稠的层导致试样溶液与电极接触的现象。

该亲水性高分子包括羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、乙基纤维素、羟丙基纤维素、明胶、聚丙烯酸及其盐、淀粉及其衍生物、马来酸酐或

30 其盐的聚合物、聚丙烯酰胺、甲基丙烯酸酯树脂、聚-2-羟乙基甲基丙烯酸酯等。

为了抑制上述表面活性剂产生的影响，除了使用亲水性高分子的方法之外，还可采用以下方法。即，仅用碳糊形成电极系的与试样溶液接触的部分，为确保导电性而使用的银糊仅用在被绝缘层覆盖的部分。使用该印刷电极时，可以不使用上述亲水性高分子层，但上述亲水性高分子还具有防止因试样溶液或试样溶液与反应试剂的混合液中的蛋白质等吸附在电极表面而使电极反应活性下降的效果。因此，即使在使用了上述印刷电极的情况下，也最好同时使用亲水性高分子。

由银及碳形成生物传感器的电极系的情况下，反应试剂中含有导电体。

该导电体可选自铁氰化钾、对苯醌、吩嗪、二茂铁衍生物(氧化型)等水溶性、且能够在酶-电极间使电子转移的化合物。

氧化电流的测定方法包括仅由工作电极和配极组成的二电极方式及工作电极、配极和参考电极组成的三电极方式。其中，三电极方式更能够进行精确的测定。

以下，例举具体实施方式对本发明进行详细说明。此外，附图都只是简图，其中各要素的相对尺寸不一定准确。

图1为本发明实施方式之一的生物传感器的分解立体图。图2为其纵截面图。

利用丝网印刷法在由聚对苯二甲酸乙二醇酯形成的绝缘性基板1上涂布银糊，形成导电片2、3及电极系的底层。然后，在该基板1上涂布含有树脂粘合剂的导电性碳糊形成包含工作电极4和配极5的电极系。此外，涂布绝缘性糊状物形成绝缘层6。工作电极4和配极5分别与导电片2和导电片3相连。绝缘层6覆盖部分导电片，工作电极4和配极5的露出部分面积一定。

以上形成了电极系的绝缘性基板1、具有气孔9的罩子8、隔板7及具有血细胞过滤功能的滤膜11按照图中点划线所示的位置关系相连，形成生物传感器。基板1和罩子8间通过隔板7的缝隙10沿基板1及罩子8形成了试样溶液供给通道。滤膜11按嵌入该试样溶液供给通道的大小截断，被设置于电极系和试样供给部位，但不覆盖电极系。13a和13b分别表示滤膜11与绝缘性基板1及罩子8接触的部分。

滤膜11的试样供给部位12的端部到电极系的端部的区域中，为了在滤膜表面设置与形成试样溶液供给通道的基板1、隔板7及罩子8不接触的区域，在与基板1及隔板7分别对应的位置设置了透孔14及15，并在罩子8上设置

了与缝隙 10 相连的 2 个凹陷部分 16。为了覆盖基板 1 及罩子 8 上的透孔 14 及 15, 在它们的外面盖上了盖子 17 及 18。由上述透孔 14 及 15 和凹陷部分 16、16 就形成了包围滤膜 11 表面的空隙部分。

透孔 14 及 15 分别由盖子 17 及 18 盖着, 但即使不盖盖子其功能也不会受损。但是, 如果不盖上盖子, 则滤膜 11 露出在外面, 所以试样溶液会从该部位蒸发, 一旦液体通过滤膜到达电极系, 就有可能出现液体逆流现象。因此, 设置了覆盖基板及罩子上的透孔的盖子 17 及 18。如果基板及盖子具有一定的厚度, 则设置凹陷部分代替透孔, 就不需要盖子 17 及 18 了。

在基板上的试样供给部位 12 滴下试样溶液, 使该溶液与滤膜 11 的试样供给部位端部接触, 则试样溶液被滤膜 11 吸收, 通过滤膜 11 除去其中的血细胞等固形成分, 将血浆导入试样溶液供给通道, 再导入传感器内部。然后, 血浆一边溶解位于覆盖电极的位置或其上的罩子内面的反应试剂, 一边从电极系附近开始直至填满到气孔 9 为止的整个试样溶液供给通道。当整个试样溶液供给通道被液体填满后, 滤膜 11 内的液体也停止流动, 此时血细胞未到达滤膜的电极系端部, 而是停留在原来的位置。因此, 设计成从滤膜 11 仅通过可填满整个试样溶液供给通道的溶液量, 血细胞未到达滤膜前端, 血浆和血细胞间存在流通阻力差的样式。

本实施例中, 通过缝隙 10 形成的试样溶液供给通道的试样供给部位端部到气孔 9 的外周的长度为 12.5mm, 缝隙 10 的宽度为 2.0mm, 缝隙 10 的深度为 0.1mm。

透孔 14 及 15 的尺寸用(与基板长度方向垂直相交的方向的长度)×(基板的长度方向尺寸)表示为 4.0×3.0mm, 凹陷部分 16 的尺寸也同为 4.0×3.0mm。基板及罩子的厚度分别为 0.35mm, 隔板厚度为 0.1mm。因此, 具有上下为 0.35mm、左右为 2.0mm 的厚度。通过试样溶液前进方向的(以下简称为空隙部分的宽度)3.0mm 的空隙部分包围滤膜 11。该空隙部分位于从试样供给部位 12 的端部开始 1mm 到电极系端部 3.0mm 的位置。前述尺寸是较理想的实施方式的一个例子, 但并不限于该尺寸。

图 2 是生物传感器的纵截面图。基板 1 的电极系上形成了亲水性高分子层 21 及覆盖该高分子层的导体层 22。形成于隔板 7 的缝隙 10 的试样溶液供给通道中配置了滤膜 11。该滤膜 11 的端部可以与电极系接触也可不接触, 但不与电极系中的工作电极 4 接触。试样溶液供给通道中, 在罩子 8 的内面由滤膜

11 的电极系端部和气孔 9 形成的区域内是酶及表面活性剂形成的层 23。在层 23 与滤膜 11 的端部接触的情况下，试样溶液能够很容易地流入层 23，但这种接触并不是必须的。

图 3 是表示本发明另一实施方式生物传感器中的隔板和滤膜的位置关系的平面图。形成试样溶液供给通道的缝隙 10 中，嵌合了滤膜的部分 10a 和存在电极系、并有滤膜过滤的试样溶液流过的部分 10b 的宽度是不同的。图 3 中，嵌合了滤膜的部分 10a 比具有电极系的部分 10b 窄。

图 4 是本发明另一实施方式生物传感器的纵截面图。虽然该传感器的结构与图 2 相同，但其中配置的反应试剂不同。该例子中，在电极系上仅形成了亲水性高分子层 21，在罩子 8 一侧设置了含浸及负载了酶、表面活性剂及导电体的多孔质载体 24，该载体与滤膜 11 的端部接触。

图 5 是本发明又一实施方式生物传感器的纵截面图。图 6 是该传感器的除去了试剂层的分解立体图。

与图 1 相同，在绝缘性基板 31 上形成了导电片 32 和 33，以及分别与导电片相连的工作电极 34 及配极 35、绝缘层 36。该基板 31 上组合了多个隔板 41、43、45、47、49 及罩子 52，在隔板 43 和罩子 52 间设置了滤膜 51。罩子 52 的透孔 53 构成了试样供给部位。设置于隔板 41、43、45、47、49 的透孔 42、44、46、48 及 50 使试样溶液供给通道沿重力方向配置。隔板 45 及 49 的透孔 46 及 50 的孔径比滤膜 51 的直径大，所以在滤膜 51 周围形成了包围该滤膜 51 的空隙部分，该空隙部分用 55 及 56 表示。隔板 47 与滤膜 51 的部分外周相连，起到确定滤膜位置的作用。隔板 41 具有使前述试样溶液供给通道的终端朝向大气开放的气孔 54。因此，从形成位于电极系上方的试样供给部位的透孔 53 到电极系的试样溶液供给通道通过毛细管作用使试样溶液沿重力方向导入，如果通过滤膜 51 过滤的血浆到达电极系，则试样溶液的流动停止。

决定包围滤膜 51 的空隙部分 55 及 56 的高度的隔板 49 及 45 的厚度最好在 $100\ \mu\text{m}$ 以上。隔板 41 的透孔 42 为试样溶液与试剂的反应提供了场所。隔板 41 的厚度最好为 $100\sim 200\ \mu\text{m}$ 。试样溶液供给通道沿重力方向配置，可使试样利用重力作用通过滤膜，然后迅速到达反应试剂层。

该例子中，在电极系上形成了 CMC 层 61 及导电体层 62，在隔板 43 的内面形成了包含酶和表面活性剂的层 63。

图 7 是本发明另一实施方式生物传感器的纵截面图。图 8 是该传感器除

去了试剂层的分解立体图。所示传感器中除了用非织造布形成的试样溶液诱导层 57 代替隔板 43 之外,其他都与图 5 及 6 所示的传感器大致相同。该例子中,在电极系上设置了 CMC 层 61 及包含酶、表面活性剂和导电体的层 64。

以下,对本发明的实施例进行说明。

5

实施例 1

为了制作胆甾醇传感器,首先,在图 1 的绝缘性基板 1 上的电极系上滴下亲水性高分子羧甲基纤维素的钠盐(以下称为 CMC)的 0.5wt%水溶液,于 50℃的温风干燥器中干燥 10 分钟,形成 CMC 层 21。然后,在 CMC 层上滴下导电体铁氰化钾的水溶液 4 μ l (相当于铁氰化钾 70mM)覆盖 CMC 层 21,于 50℃的温风干燥器中干燥 10 分钟后,形成铁氰化钾层 22。

此外,在罩子 8 和隔板 7 的缝隙 10 形成的凹部滴下作为表面活性剂的 TritonX-100 的 2wt%乙醇溶液 2 μ l,室温干燥 3 分钟后,形成表面活性剂层。然后,在溶解了来自奴卡氏菌的胆甾醇氧化酶(EC1.1.3.6,以下简称为 ChOD)和来自假单胞菌的胆甾醇酯酶(EC.3.1.1.13,以下简称为 ChE)的水溶液中添加 TritonX-100。在表面活性剂层上滴下 1.5 μ l 该混合水溶液,通过液氮冷冻后,将其装入梨形烧瓶内,在冷冻干燥器中干燥一晚,形成含有 1 单位(U)/传感器的胆甾醇氧化酶、2.5U/传感器的胆甾醇酯酶及 2wt%的表面活性剂的酶/表面活性剂层 23。然后,将裁剪成 2mm \times 8mm 的长方形的玻璃薄膜(ADVANTEC 公司制 GC50,厚度为 0.19mm)设置在图 1 所示位置,使其不与工作电极接触。

如图 1 所示,为了在滤膜薄膜设置不与形成试样溶液供给通道的绝缘性基板、隔板及罩子接触的区域,在试样溶液供给通道的设置了滤膜的位置上设置了透孔 14 及 15 和凹陷部分 16、16。它们的尺寸如前所述。

在基板 1 的试样供给部位 12 滴下作为试样溶液的全血试样 20 μ l。然后,通过透明材料制成的罩子 8 目视观察,确认从滤膜过滤的液体到达试样溶液供给通道的气孔 9 的外周部分开始的 3 分钟后,以配极为基准从正极方向对工作电极施加 +0.5V 的脉冲电压,测定 5 秒钟后的电流值。其结果是,能够获得来源于血清中的胆甾醇浓度的感应值。

本实施例中,通过冷冻干燥形成了酶/表面活性剂层,也可通过风干形成该层。但是,这种情况下,由于反应试剂层的溶解性大幅度恶化,所以过滤的液体从到达试样溶液供给通道的气孔 9 的外周部分到反应结束需要很长时间。

实施例 2

实施例 1 中，在试样溶液供给通道的罩子内面通过冷冻干燥形成的酶/表面活性剂层 23 与覆盖基板的电极系、通过风干形成的 CMC 层 21 及铁氰化钾层 22 一起构成了反应试剂系统。本实施例中，如图 4 所示，设置了含浸负载了酶、
5 表面活性剂及导电体的多孔质载体 24，该载体与滤膜 11 的端部接触，该载体和在覆盖基板的电极系位置通过风干的 CMC 层 21 形成反应试剂系统。

多孔质载体上负载的构成反应试剂系统的部分试剂与通过冷冻干燥负载的情况相同，都能够提高反应试剂对试样溶液的溶解性。

首先，与实施例 1 同样在电极系上滴下亲水性高分子 CMC 的 0.5wt%水溶液，于 50℃的温风干燥器中干燥 10 分钟，形成 CMC 层 21。
10

然后，用纤维系粘合剂(塞梅代恩公司制塞梅代恩 C)使裁剪成 2×4.5mm 的以玻璃纤维为主成分的毛毡形成的多孔质载体 24 与滤膜 11 的端部接触，将其粘合固定在图 4 所示的试样溶液供给通道的罩子侧的位置。

与实施例 1 相同，在该多孔质载体 24 上滴下溶解了胆甾醇氧化酶、胆甾醇酯酶、铁氰化钾及 TritonX-100 的水 5 μ l，均匀渗透后，于 50℃的温风干燥器干燥 15 分钟。
15

然后，与实施例 1 同样，配置滤膜 11，粘合前述罩子部件和基板 1，制成生物传感器。但是，由于多孔质载体 24 的厚度约为 0.1~0.2mm，所以，与试样溶液供给通道的滤膜 11 相比，电极系中的基板 1 和罩子 8 间的距离比实施例 1 的 0.1mm 大，为 0.3mm。因此，实施例 2 所用的滤膜 11 为 GB100R。
20

在试样供给部位滴下全血试样 3 分钟后，上述生物传感器可显示出来源于胆甾醇浓度的感应值。

以上实施例中，基板 1 及罩子 8 都是用透明材料制成的，这样能够通过目视确认试样的流动情况。

以上实施例中，形成试样溶液供给通道的缝隙 10 的有滤膜嵌合的部分和存在电极系、有从滤膜过滤的试样流入的部分的宽度是相同的，但任何一部分都可以采用较狭小的形状。如此的例子中的隔板及滤膜的位置关系及形状如图 5 所示。
25

只要构成反应试剂系统的试剂的配置及负载方法能够使构成反应试剂系统的试剂能够迅速溶入试样溶液，使酶反应顺利进行即可，并不仅限于本实施例的条件。
30

产业上利用的可能性

如上所述，本发明通过防止含有血细胞等固形成分的试样溶液中的固形成分与电极系或反应试剂系统接触，提供了测定精度和感应值的稳定性都有所提高的生物传感器。

5

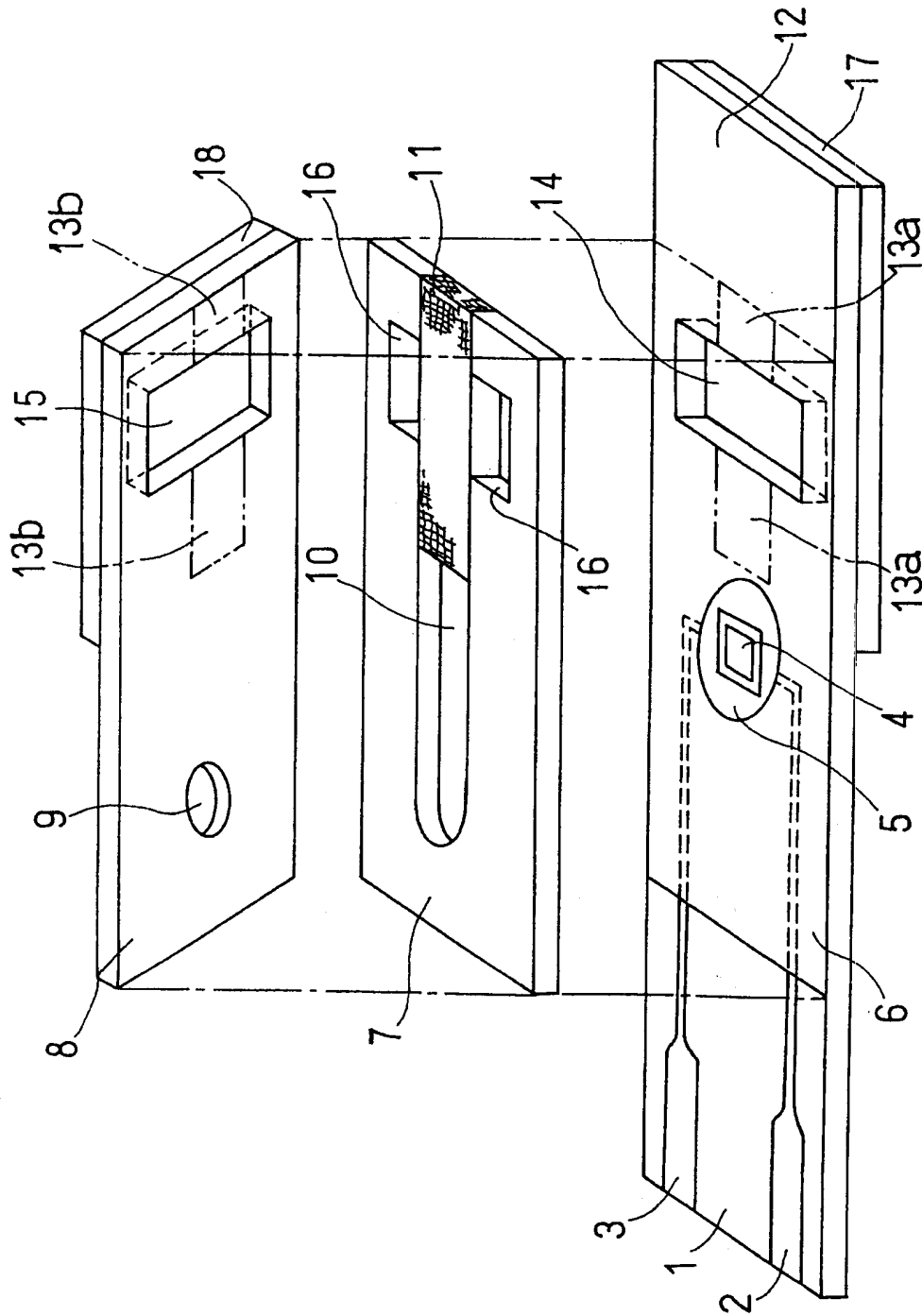


图 1

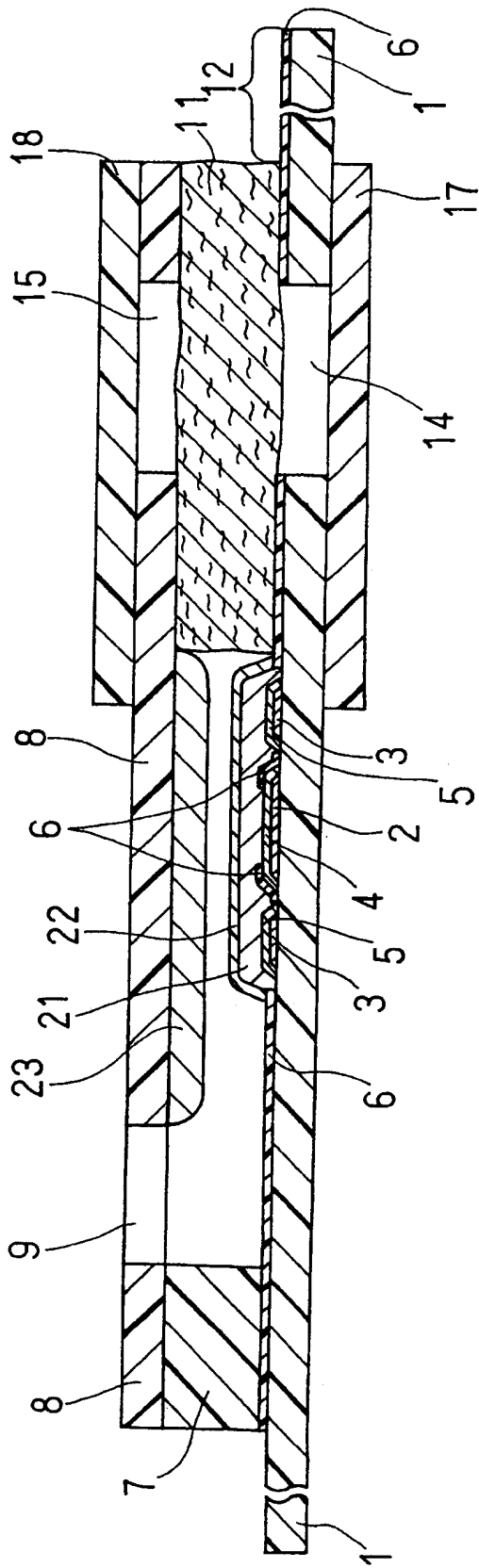


图 2

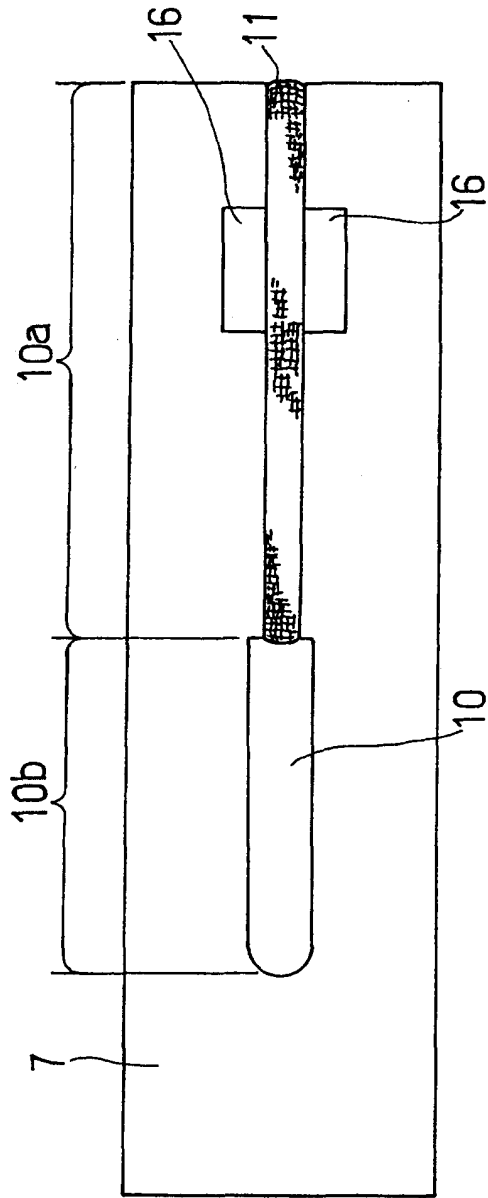


图 3

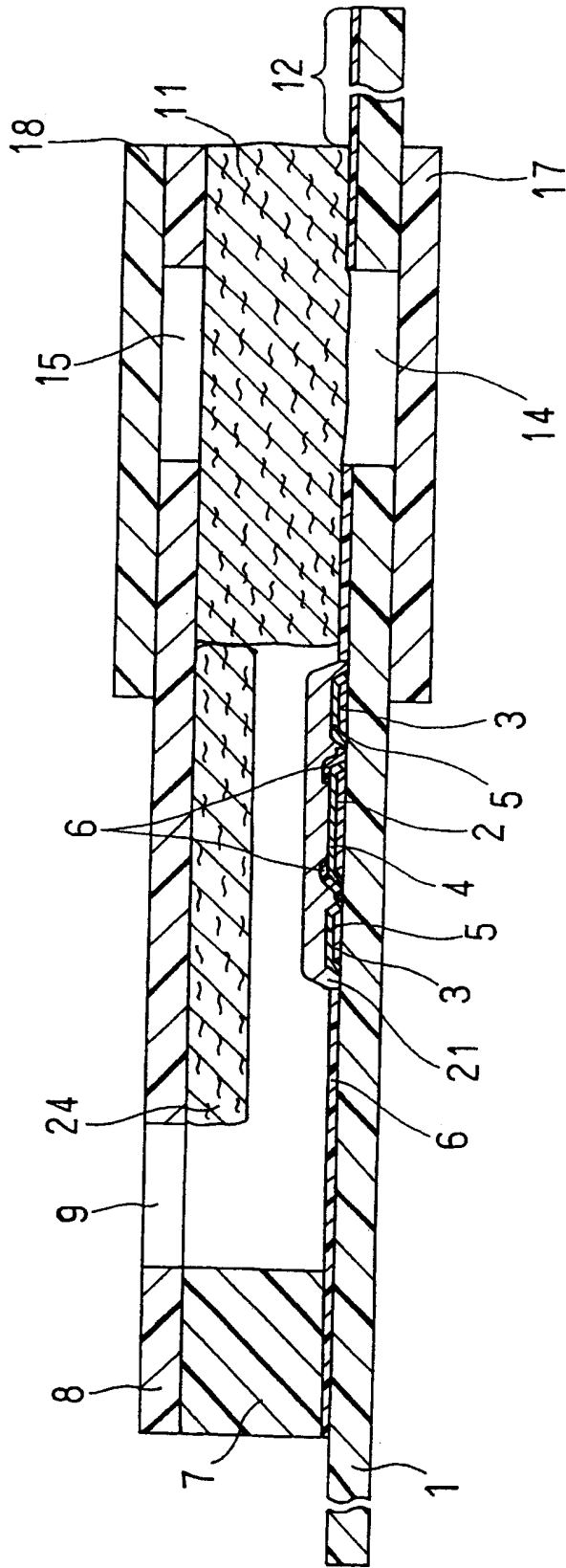


图 4

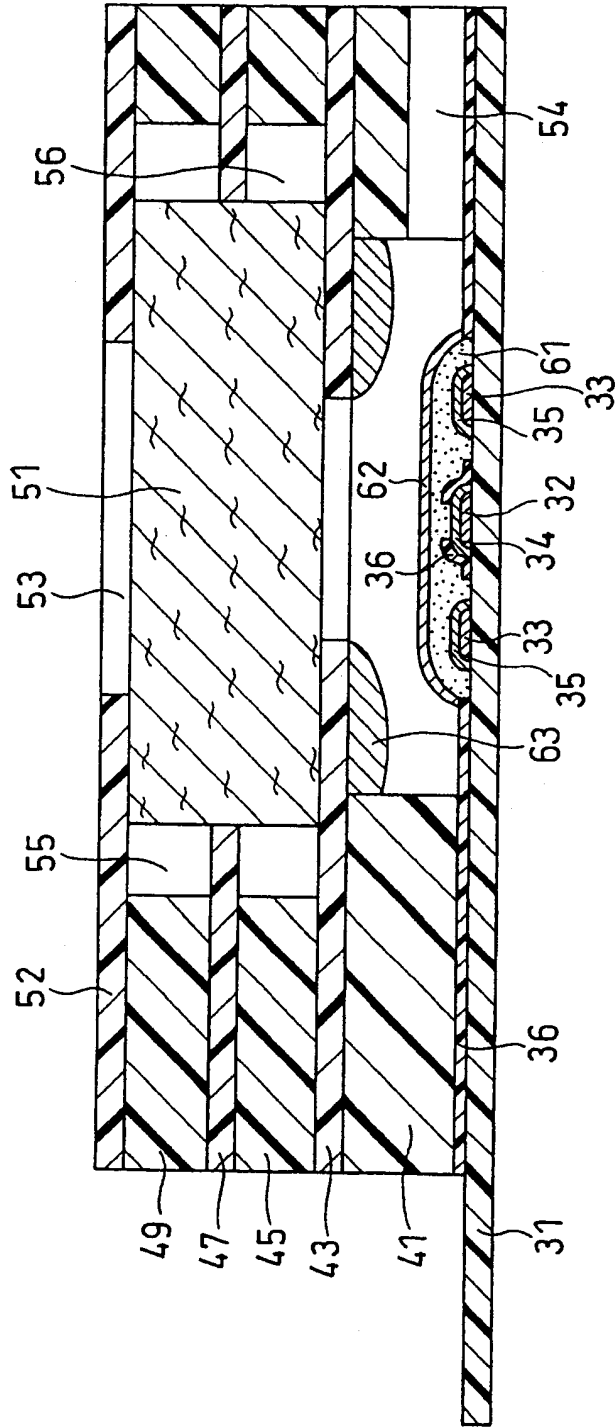


图 5

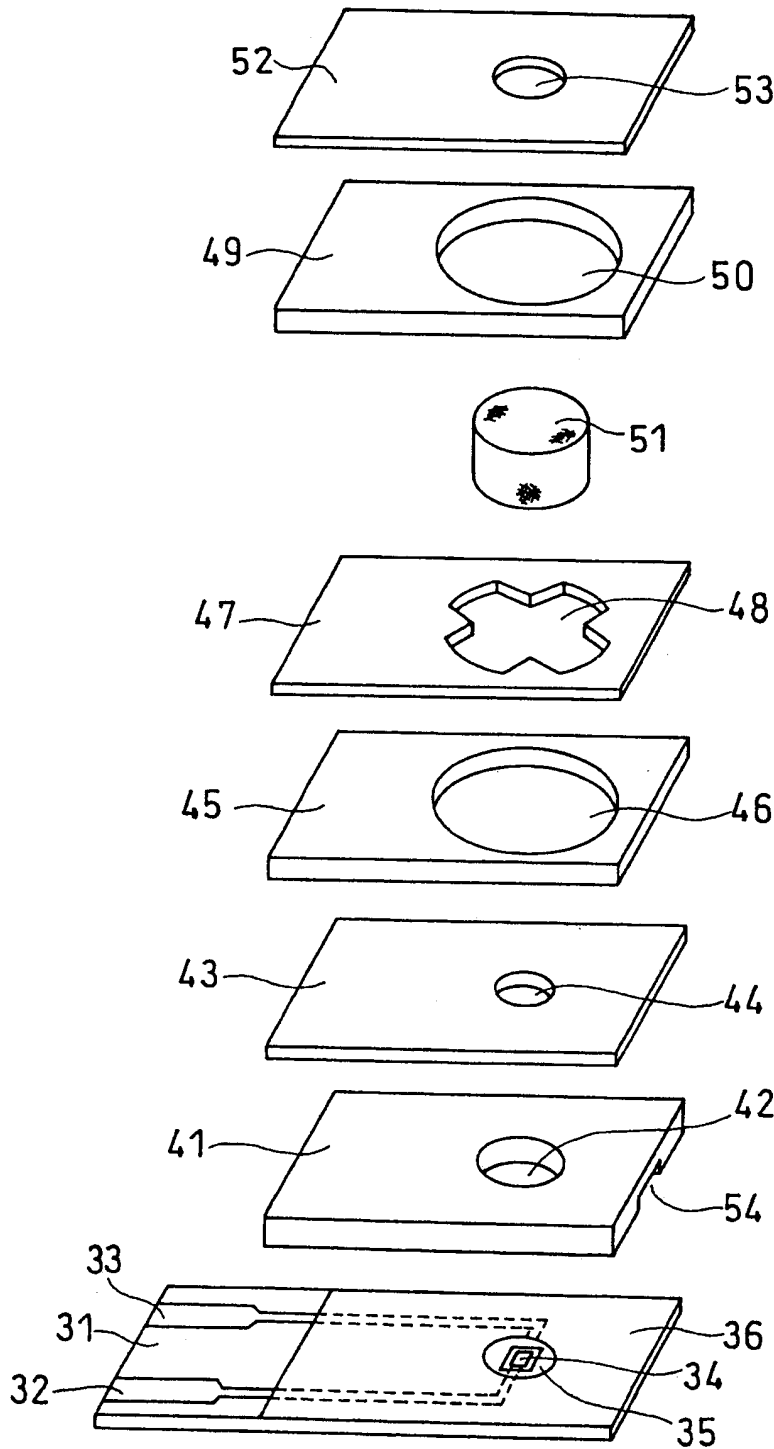


图 6

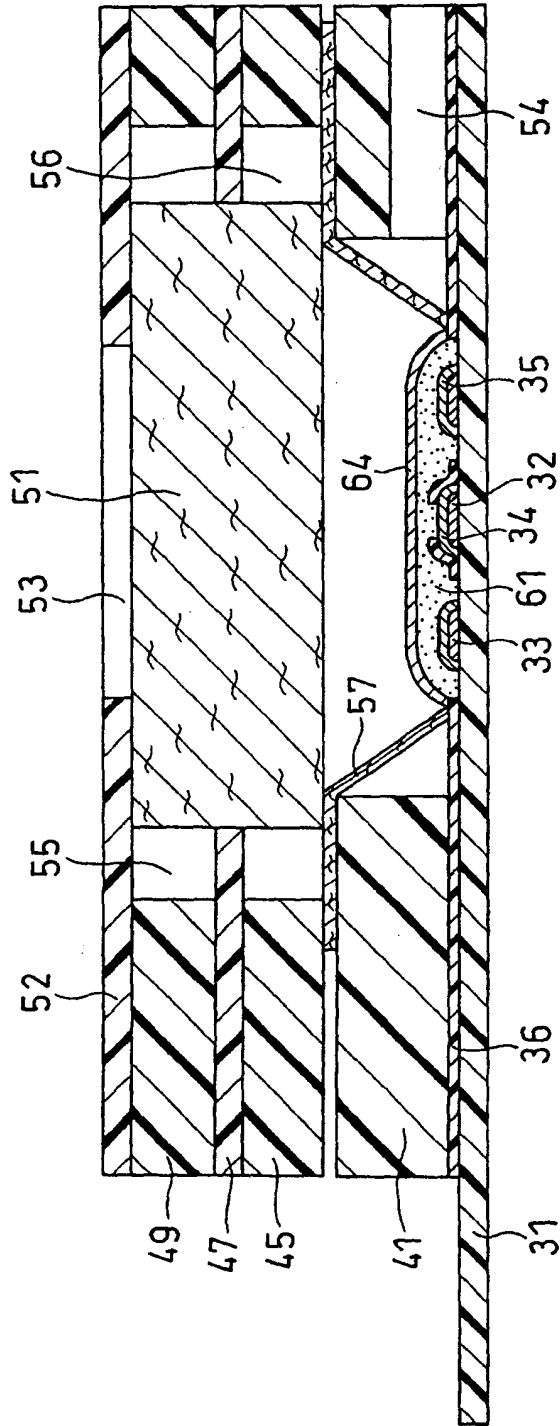


图 7

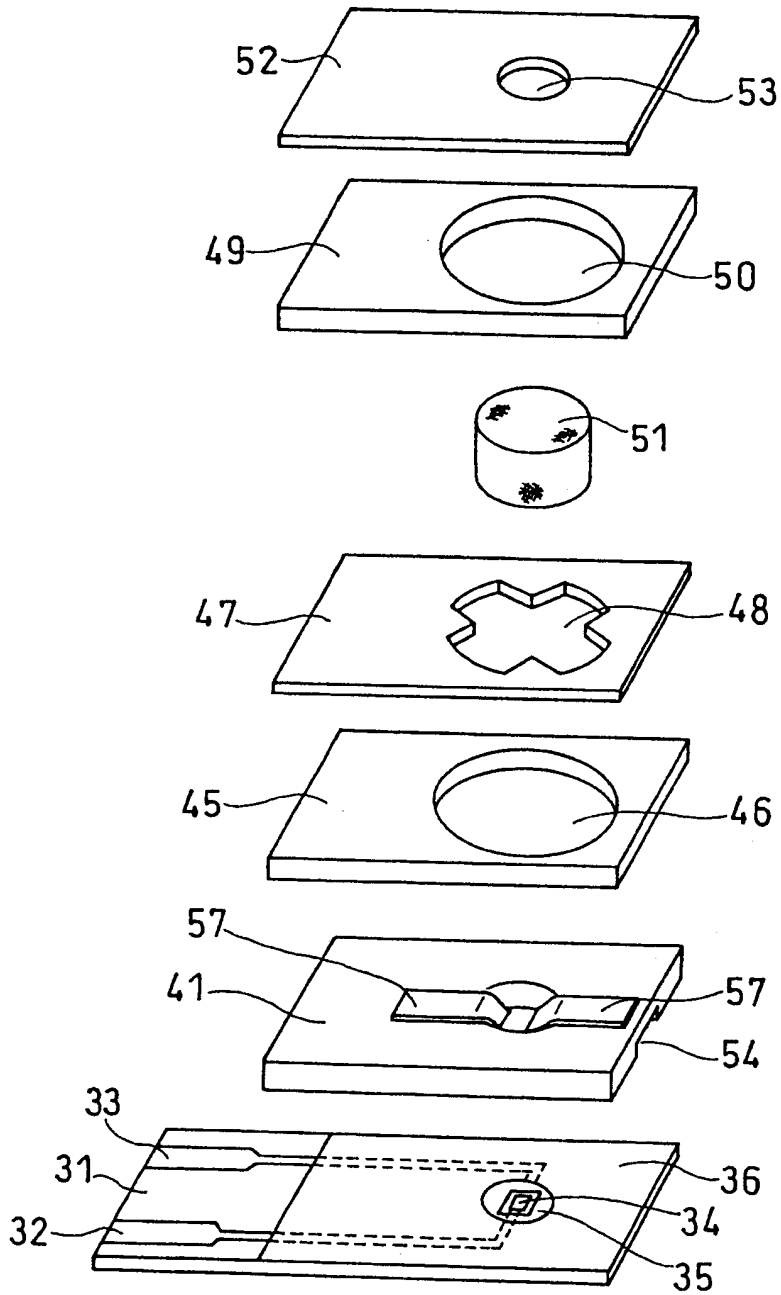


图 8

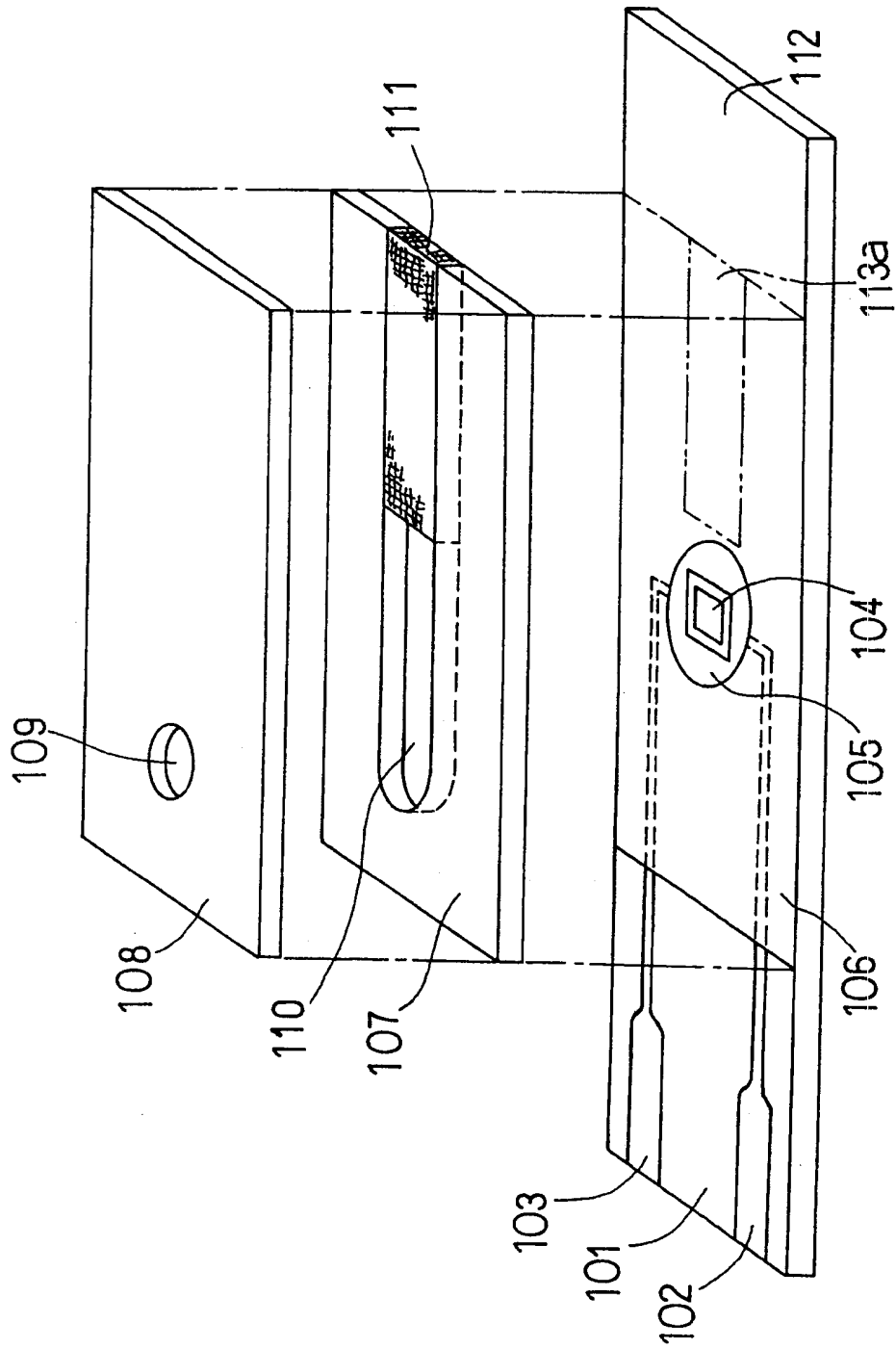


图 9