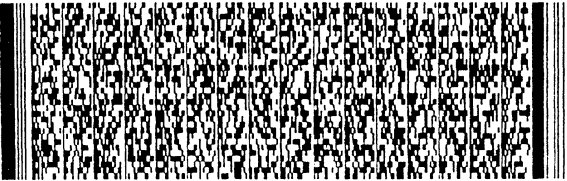


申請日期： 87-10-17	案號： 87117181
類別： (701/N 2/60)	

(以上各欄由本局填註)

公發請專利 說明書		584723
一、 發明名稱	中 文	用於輔因子之再產生之生物感測器電極中介體
	英 文	BIOSENSOR ELECTRODE MEDIATORS FOR REGENERATION OF COFACTORS
二、 發明人	姓 名 (中文)	1. 尼苟 J. 佛若 2. 葛帝 S. 山賀拉 3. 傑瑞 L. 沃金 4. 史帝芬 沃特
	姓 名 (英文)	1. NIGEL J. FORROW 2. GURDIAL S. SANGHERA 3. JARED L. WATKIN 4. STEPHEN WALTERS
	國 籍	1. 英國 2. 美國 3. 英國 4. 英國
	住、居所	1. 英國奧斯根市亞賓頓剛迪路6號 2. 美國麻州貝福市寇斯比道4A號 3. 英國牛津市亞賓頓凱斯比路11號 4. 英國伯明罕市艾吉貝斯頓史丹摩路82號4樓
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	1. 美商亞培公司
	姓 名 (名稱) (英文)	1. ABBOTT LABORATORIES
	國 籍	1. 美國
	住、居所 (事務所)	1. 美國伊利諾州亞培公園市亞培公園路100號
	代表人 姓 名 (中文)	1. 查理士. 姆. 布魯克
	代表人 姓 名 (英文)	1. CHARLES M. BROCK
		

本案已向

國(地區)申請專利

美國 US

申請日期

1997/10/16 60/061,982

案號

主張優先權

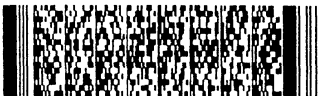
有

W3-011111

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼



五、發明說明 (1)

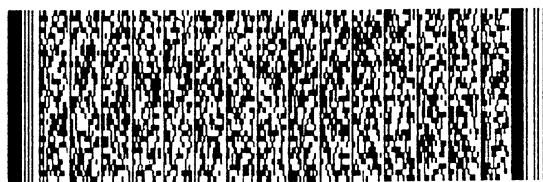
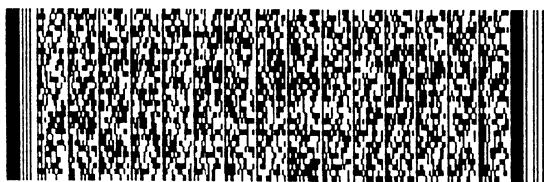
發明背景：

本發明係在電流分析之生物感測器之電極的共同範圍內。更特定而言，本發明係在為了在這些電極中使用輔因子的再循環，用來當作中介體之化合物的範圍內。

在許多具有臨床價值之受酶質，像是葡萄糖、D-3-羥基丁酸鹽、乳酸鹽、乙醇和膽固醇中，NAD-和NADP-依賴性酵素是相當任人感興趣的。可藉著合併該類酵素，來設計用來檢測這些受酶質和其他分析物的電流分析之電極，並利用該電極經由還原之輔因子NADH和NADPH居間的氧化作用，來建立電的傳導。

NAD-和NADP-依賴性酵素通常是細胞內的氧化還原酶(EC 1. x. x. x)。再根據該氧化還原酶在其上作用之受酶質捐贈者的身份將其分類。例如，在受酶質內之CH-OH基團上作用的氧化還原酶，被歸類為EC 1.1. x. x，而在受酶質之醛或酮基團上作用的那些，則被歸類為EC 1.2. x. x。有些重要的分析物(例如葡萄糖、D-3-羥基丁酸鹽、乳酸鹽、乙醇和膽固醇)，是EC 1.1. x. x酵素的受酶質。

氧化還原酶的種類，亦可根據該酵素所使用之受體的種類來分。與本發明有關之酵素，有 NAD^+ 或 NADP^+ 作為受體，並將其分類為EC 1. x. 1. x。這些酵素通常在其活性部位具有硫氫基，並因此可被具有硫醇-反應性、諸如碘乙酸鹽之類的試劑不可逆地抑制。不可逆之抑制劑形成穩定的化合物，通常經由與特定胺基酸殘基(例如半胱胺酸或Cys)形成共價結合，其為酵素作用不可或缺的。例如，藉著碘



五、發明說明 (3)

可分別為氫、經取代或未經取代之烷基、芳基、雜芳基或胺基，羥基、烷氧基或芳氧基。在一些案例中，X或Y可以是官能基 CZ^1Z^2 ，其中 Z^1 和 Z^2 為吸電子基團。

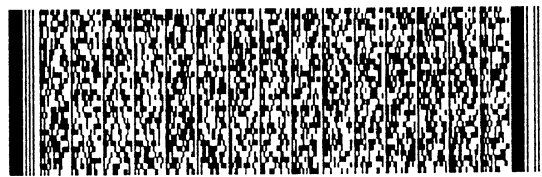
可以一或多個墨底層之方式，將試驗試劑放置在電極上。可以單層之方式將試驗試劑網印在工作電極上。

該元件可以是電流分析之乾-條感測器，其包括延長的電絕緣載體，在其上具有一對縱走的、大體上平行的導電軌道，以及一對電極。可將電極分別以電連接到不同的軌道上；一個電極可以是參考/反電極，而另一個電極可以是工作電極。該元件亦可包括假電極。再者，該元件更可以包括放置在適當之處，在將試樣導入電極之前過濾該試樣的膜。

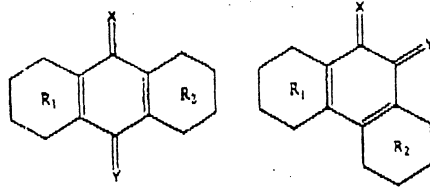
感測器可額外地包括電絕緣載體材質的支撐條(例如合成的聚合物，像是聚乙烯氣，或合成聚合物的混合物)。

中介體化合物可以是苯醌。適當的苯醌的實例包括1,10-啡啉苯醌、1,7-啡啉苯醌和4,7-啡啉苯醌。

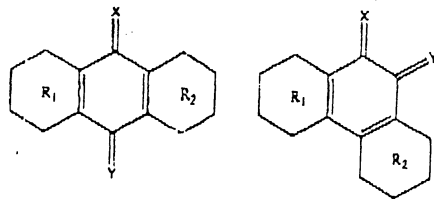
在其他的具體實施例中，本發明的特徵為電流分析感測器之電極條具有讀出。該條包括改成讀出之可釋放附件形式的支撐物，第一個導體沿著該支撐物延伸，並包括導電元件以便與讀出連接；工作電極與第一個導體接觸，並位在可與試樣混合物接觸之處；第二個導體沿著該支撐物延伸，並包括導電元件以便與讀出連接；參考/反電極與第二個導體接觸，並位在可與試樣和第二個導體接觸之處。該條之活性電極包括具有下列其中之一之中介體化合物：



五、發明說明 (4)



本發明其他的具體實施例，其特徵為在電極和菸鹼醯胺輔因子之間轉移居間電極的方法。該方法包括在菸鹼醯胺輔因子依賴性酵素的存在下，使用中介體化合物的方法，其中該中介體化合物為醌型的化合物，不能以不可逆之方式與硫醇基團結合。該中介體化合物可，例如，在相鄰芳香族環中具有反應性之不飽和鍵結。穩定之中介體化合物包括具有下式的那些：

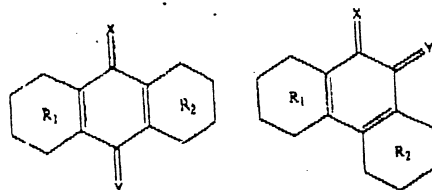


例如，該中介體化合物可以是1,10-啡啉苯醌、1,7-啡啉苯醌和4,7-啡啉苯醌。

在另外的具體實施例中，本發明之特徵為印墨。墨水包括菸鹼醯胺輔因子-依賴性酵素，菸鹼醯胺輔因子，以及具有下式其中之一的中介體化合物：



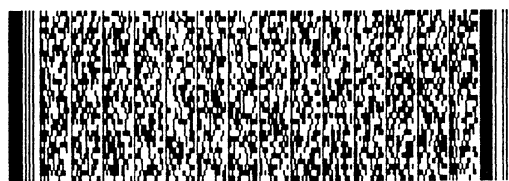
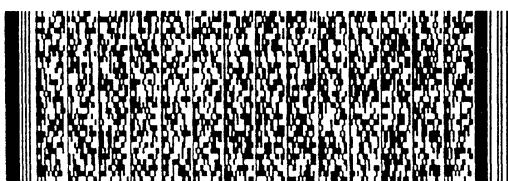
五、發明說明 (5)



例如，該中介體化合物可以是1,10-啡啉苯醌、1,7-啡啉苯醌和4,7-啡啉苯醌。該酵素可以是例如酒精脫氫酶、乳酸鹽脫氫酶、3-羥基丁酸鹽脫氫酶、葡萄糖-6-磷酸鹽脫氫酶、葡萄糖脫氫酶、甲醛脫氫酶、蘋果酸脫氫酶，或3-羥基類固醇脫氫酶。

除非另行定義，所有在本文中使用的技術和科學名詞，均具有與熟諳本發明所屬之技藝者一般瞭解的相同意義。雖然在實行或試驗本發明時可使用類似或與在本文中描述的那些相同的方法和材料，但是在下文中將描述較佳的方法和材料。所有在本文中提及的出版物、專利申請案、專利、技術手冊和其他參考文獻，均合併於此以作為參考。在有牴觸時，將對照本發明申請案，包括其定義。此外，材料、方法和實例僅作為解釋之用，並非企圖加以限制。

新穎之中介體的優點，是它們在酵素中對活性部位之硫醇基團無反應性。這改善了生物感測器電極的穩定性和儲存壽命至料想不到的程度。再者，由於穩定性的結果，可將酵素與該中介體一起併入印墨或劑量溶液中，有利於該生物感測器的建構。使用不是酵素之不可逆抑制劑的中介體，將導致在生物感測器製造期間，保留大部份的酵素活



五、發明說明 (6)

性。NAD- 和 NADP- 依賴性脫氫酶酵素通常是昂貴和不穩定的，因此其穩定性的改善是非常令人想要的。

有利的是，在本文中揭示的化合物亦可用來當作中介體，使輔因子 NADH 和 NADPH 與各式各樣的 NAD- 或 NADP- 依賴性酵素偶聯；在免疫化學程序中作為抗原或抗體的標記；以及在其他電化學和生物電化學範圍中的應用。該中介體需要低的氧化電位，以便在與 NADH 或 NADPH 反應之後再氧化。當以全血測試時是特別有利的，其中來自外源性電活化粒種（例如抗壞血酸、尿酸）之干擾的電位是特別高的。低電位是有利的，因為它可能免除了需要假電極以便移除試樣中的電活化粒種。再者，中介體的氧化天然形式可能使背景電流降低，利用還原該中介體將可使其出現。

從下列的詳細說明中，本發明的其他特徵和優點將是顯而易見的。

圖片簡述：

圖1為根據本發明一個具體實施例之電極條的剖視圖。

圖2為裝配好之電極條的代表。

圖3為關於印刷含有1,10-啡啉苯醌之電極，以微安培計之電流對以mM計之NADH濃度的作圖。

圖4為關於印刷含有麥爾多拉(Meldola's)藍之電極，以微安培計之電流對以mM計之NADH濃度的作圖。

圖5為顯示在將HBDH與各種中介體一起培養之後，剩餘之酵素活性（也就是按最初活性的百分比計）的柱狀圖。

圖6為關於印刷含有1,10-啡啉苯醌之電極，以微安培計



五、發明說明 (7)

之電流對以mM計之D-3-羥基丁酸鹽濃度的作圖，在4、14和26週之後測試D-3-羥基丁酸鹽脫氫酶和 NAD^+ 。

圖7為關於印刷含有麥爾多拉藍之電極，以微安培計之電流對以mM計D-3-羥基丁酸鹽濃度的作圖，分別在2和14週之後測試D-3-羥基丁酸鹽脫氫酶和 NAD^+ 。

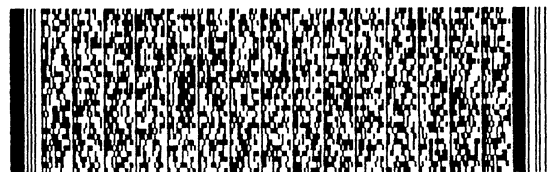
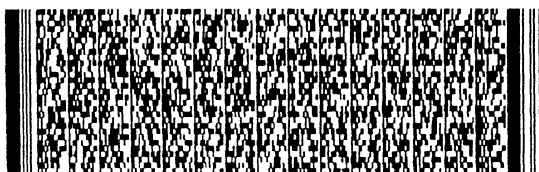
圖8為關於印刷含有1,10-啡啉苯醌、葡萄糖脫氫酶和 NAD^+ 之電極，在全血中測定對葡萄糖之反應的作圖。

發明說明

揭示一類由於其不能與硫醇不可逆結合而被選出來，並可用來作為 NADH 或 NADPH 中介體的化合物。這些中介體的結構、電子和空間特性，使得它們幾乎無法與硫醇反應。因為實際上從與 NAD^- 和 NADP^- 依賴性脫氫酶之活性部位硫氫基的不可逆結合作用中排除了這些中介體，所以阻遏了該酵素的失活和後續生物感測器之穩定性的喪失。

NADH 和 NADPH 中介體可使用於分析物之電流分析酵素感測器的製造中，其中該分析物是出現在該感測器中之 NAD^- 和 NADP^- 依賴性酵素的受酶質，像是在歐洲專利125867-A號中描述的那些種類。因此，可以製造用來測定試樣中分析物之存在的電流分析酵素感測器，尤其是含水的試樣。例如，該試樣可以是複雜的生物試樣，像是生物體液（例如全血、血漿或血清），且該分析物可以是天然存在的代謝產物（例如葡萄糖、D-3-羥基丁酸鹽、乙醇、乳酸鹽或膽固醇），或是被導入的物質，像是藥物。

對於電流分析之酵素感測器的製造特別有用的是，本發



五、發明說明 (8)

明更提供了含有在本文中揭示之NADH和NADPH中介體的墨水。

本發明亦包括上文之中介體的任何前驅物、加合物或還原(無色)形式，其可就地藉著氧化或分解作用，轉變為相對應的活性中介體。這類前驅物或加合物可包括半縮醛、半硫代縮醛、環狀縮醛、金屬鄰-苯醌複合物、質子化的形式、丙酮加合物等等。

在表1中提供了可與新穎中介體一起使用之酵素的非限制一覽表。

表1

1.1.1.1	酒精脫氫酶
1.1.1.27	乳酸鹽脫氫酶
1.1.1.31	3-羥基丁酸鹽脫氫酶
1.1.1.49	葡萄糖-6-磷酸脫氫酶
1.1.1.47	葡萄糖脫氫酶
1.2.1.46	甲醛脫氫酶
1.1.1.37	蘋果酸鹽脫氫酶
1.1.1.209	3-羥基類固醇脫氫酶

採用本發明之中介體的電流分析酵素感測器通常使用試驗元件，例如單一用途的長條。可拋棄之試驗元件可帶有工作電極，例如帶有試驗試劑，包括酵素、菸鹼醯胺輔因



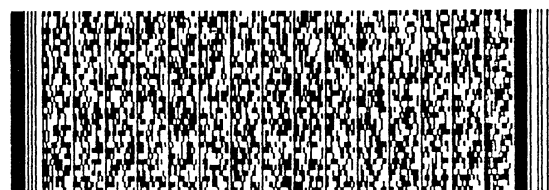
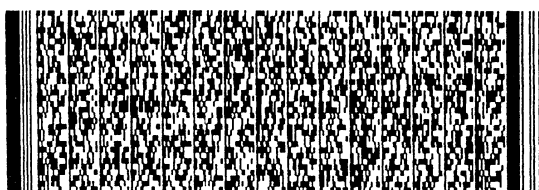
五、發明說明 (9)

子(也就是 NAD^+ 或 NADP^+)，產生代表分析物含量之電流的本發明中介體，以及參以/反電極。試驗試劑可以是在試驗元件中與工作電極聯合的一或多層墨底層。因此，感測器電極可以包括，例如藉著印刷、噴霧或其他適當的沉積技術所形成的電極。

參照圖1和2，電極支撐物1，通常以PVC、聚碳酸酯或聚酯，或聚合物的混合物(例如瓦龍(Valox)，聚碳酸酯和聚酯的混合物)製成，支持三個導電碳墨印刷的軌道2、3和4。印刷軌道限定了工作電極5的位置，在其上沉積工作電極墨水16，參考/反電極6、裝滿指示劑之電極7，以及接觸器8、9和10。

分別以銀/氯化銀顆粒軌道11、12和13覆蓋導電軌道的延長部份(增加軌道12與參考電極6重疊的暴露面積14)，並利用一層忌水性的電絕緣材料15再覆蓋之，保持僅有參考/反電極14的位置暴露出來，工作電極5、裝滿指示劑之電極7和接觸區8、9和10。該忌水性的絕緣材料係用來防止短路。因為該絕緣材料是忌水性的，其可用來限制試樣使其僅暴露在電極下。適當的絕緣材料為Sericard，可購自Sericol Ltd. (Broadstairs, Kent, UK)。可視需要將第一個網層17、第二個絕緣層18、第二個網層19、第三個絕緣層20和磁帶21重疊在該忌水性絕緣材料上。

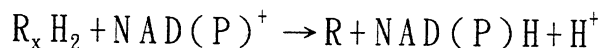
可將個別的墨水混合物塗抹在載體上之導電軌道上，例如，非常接近連接第二個軌道的參考電極14。以此方式可產生感測器，其能夠對少量的血液試樣，或其他覆蓋在有



五、發明說明 (10)

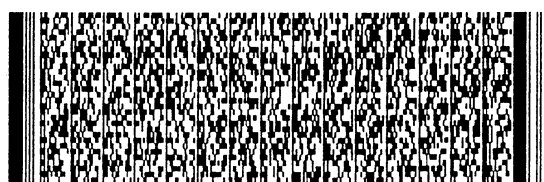
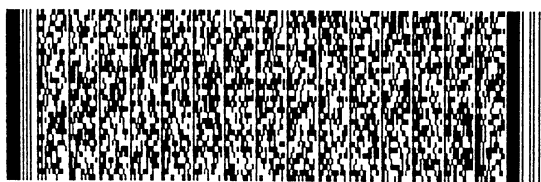
效電極區5上的液體產生功能。該混合物最好是，但並非絕對地，藉著網印塗抹在載體上。

一般而言，NAD(P)-依賴性脫氫酶根據下式來催化反應：



其中 RH_2 代表受酶質(分析物)且 R 為產物。在前進的反應過程中， $NAD(P)^+$ (也就是 NAD^+ 或 $NADP^+$)被還原成 $NAD(P)H$ 。適當的電流分析感測器提供電化學中介體，其可再氧化 $NAD(P)H$ ，藉此使 $NAD(P)^+$ 再產生。發生在電極處的再氧化作用產生電流，其指示受酶質的濃度。

在一個具體實施例中，提供乾式的感測器。該感測器包括延長的電絕緣載體，在其上具有一對縱走的、大體上平行的導電軌道，對每個軌道提供相同的末端，利用電連接之方式讀出並供給電極，其中一個電極為參考/反電極，而另一個是與試驗試劑在一起之工作電極。感測器可以電絕緣載體材料的支撐條之形式建構，像是合成的聚合物(例如PVC、聚碳酸酯或聚酯，或聚合物的混合物，如瓦龍)，帶有兩個電極，在其末端之間支撐著導電軌道。例如，電極可在載體條上，採用兩個並排的長方形區域，如圖2所示(也就是電極14和16)。可將這類區域設計成由一滴試樣，像是全血覆蓋的目標區，以便測試分析物。如果需要，可使用非-長方形的區域(例如菱形、半圓形、圓形



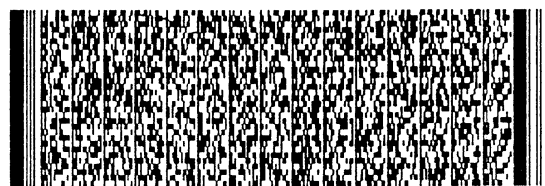
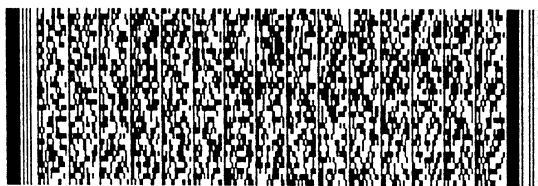
五、發明說明 (11)

或三角形區域)，為了與液態試樣最適當地接觸而提供目標區。

載體包括至少兩個電極，稱為參考/反電極和工作電極。亦可包括其他的電極，如假電極。這些其他的電極，可像工作電極一樣地調製(也就是與試驗試劑聯合)，但是缺少一或多種工作電極的活性成份。假電極，例如，可以提供更可靠的結果，如果通過工作電極之電荷減去通過假電極之電荷，此時所得的電荷可能被認定是因為感興趣之反應。

可在目標處或之上提供膜，以便完成過濾功能。例如，在試樣進入試驗條之前，從試樣中過濾血球細胞的膜。可購得之膜的可用實例包括Hemasep V, Cytosep和Hemadyne (Pall Biosupport, Fort Washington, NY 11050)。另外亦可就地鑄造過濾或細胞分離膜。可藉著鑄造忌水性聚合物，像是乙酸纖維素、聚乙烯醇縮丁醛和聚苯乙烯，及/或親水性聚合物，像是羥丙基纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇和聚乙酸乙烯酯。

在其他的具體實施例中，提供單獨使用的可拋棄式電極條，以便附接在感測器系統之單獨讀出的電路組件上。該條可檢測在液態混合物中代表分析物的電流。該條包括延長的支撐物，適合以可釋放之方式附接在讀出的電路組件上；第一個導線，沿著該支撐物延伸，並包括連接讀出電路組件之導電元件；在該條上的工作電極，與第一個導線接觸，並置於可接觸該混合物之處；第二個導線，沿著該



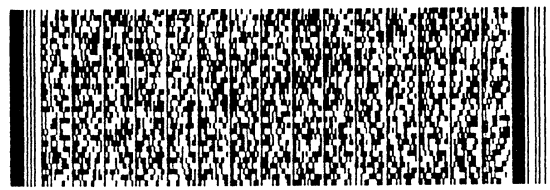
五、發明說明 (12)

支撐物延伸，包括連接讀出電路組件之導電元件；以及參考/反電極，其與第二個導電元件接觸，並置於與該混合物接觸之處，且第二個導線如圖1所示。

工作電極可包括在支撐物上的印刷層，而該印刷層本身可包括NAD或NADP-依賴性脫氫酶酵素，能夠催化涉及該酵素之受酶質的反應。該層亦可包括相對應的菸鹼醯胺輔因子，以及能夠在酵素-催化的反應與第一個導線之間，經由NADH或NADPH來轉移電子的本發明中介體，產生代表酵素和分析物1兩者之活性的電流。

可將第一個導電元件和活性電極與第二個導電元件和參考/反電極隔開，出現在有效混合區之電極的大小和位置，小得足以被一滴血液或其他受試試樣完全覆蓋；通常反應帶為5毫米平方，但亦可像25毫米平方那樣大。為了以電流分析檢測該酵素之活性，使受試試樣完全橫過活性電極和參考/反電極的電路。

在本發明較佳的具體實施例中，藉著使用不僅包含酵素、菸鹼醯胺輔因子和中介體的調配物，還包括填料和黏合劑之成份，其可引起工作電極在以其中在測定期間發生中介體之氧化和還原作用的動力學模式測定時，對感測到之感興趣的分析物濃度得到增強的單調反應，來產生工作電極。這個概念在應用試樣時，在工作電極表面上提供一層穩定的反應層。這容許使用在試樣中屬於微溶性的中介體。因為該中介體藉著與酵素、輔因子和分析物的反應而被還原，它被保留在非常接近電極表面之處，使得它能夠



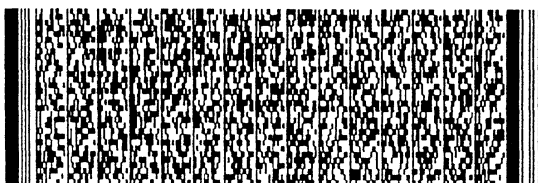
五、發明說明 (13)

輕易地再氧化，而沒有明顯的沉澱喪失。該薄反應層的維持亦容許在少量體積之全部試樣中發生全面的分析反應，所以事實上所測得的是得自大量樣本之分析物流到該反應層上的通量。

該反應層需要至少在經營可再現之動力測量的時間內維持穩定。通常這類測定的時間範圍在大約5到60秒之間，雖然較長時間的穩定性是較佳的。通常，感興趣之可拋棄式電極條是大量生產的，並因此想要與任何需要之特性有關的安全界限，以便解釋在任何大量製造過程中的固有變化。

可藉著填料和黏合劑的適當混合，來改良反應層的穩定性。該層最好是充份地穩定，以便在感興趣之特定分析物的整個濃度範圍內，在動力學測量中，得到接近直線的可再現反應。例如，就酮體(以羥基丁酸鹽來測定)而言，將是在大約1到8 mM之間，而就葡萄糖而言，將是在大約2到40mM之間。

動力學的測量涉及該中介體在氧化狀態到還原狀態之間的循環。該循環的速率，反映出在該試驗過程中觀察到的電流，係依賴在試樣中分析物的濃度。分析物的濃度越高，則在酵素氧化該分析物的過程中被還原的酵素輔因子就越多。在再氧化輔因子時，中介體變成還原狀態，然後在電極表面上再將其氧化。然而，因為它的溶解度非常低，僅有少量的中介體立刻用來還原的輔因子反應。結果，與還原輔因子反應，並在電極上再氧化的中介體，然



五、發明說明 (14)

後將會與進一步還原的輔因子反應，而這持續通過動力學測量的過程。因此，還原輔因子之濃度越高(反映在試樣中分析物的濃度越高)，中介體循環的推動力就越大，因此使該循環的速率就越高。

在一些案例中，輔因子亦可在動力學測量期間參與在氧化狀態和還原狀態之間的循環。這依賴是否一開始有足量的輔因子出現，轉變所有在反應層中出現的分析物。如果一開始只有不充份的輔因子存在，使氧化輔因子再生，它將藉著再度變成還原狀態而促進殘留在反應層中之任何分析物的氧化作用。

然而，重要的特定濃度之分析物，可再現地導致在動力學試驗中對特定電極條的設計產生相同的信號，並在整個感興趣的濃度範圍內，信號隨著分析物之濃度單調地增加，最好是線性地增加(換句換說，信號是該分析物濃度的真函數)。這容許電極條的製造者對指定的一批電極條建立全面性的刻度校正，以便在標準試驗條件下，從指定條中獲得任何的指定信號，與特定的分析物濃度有獨特的關連。因此，在感興趣的濃度範圍內沒有實際上會影響信號之分析物濃度以外的無法控制之變數是很重要的。

信號可以是在試驗開始之後，在固定時間內觀察到的電流，或可以是在試驗開始之後，在一段固定的期間內發生的電流積分(本質上是在這樣一段期間內轉移的電荷)。藉著以試樣覆蓋工作電極和參考/反電極，然後在它們之間施加電位，來經營該試驗。然後在一段期間內觀察到流過

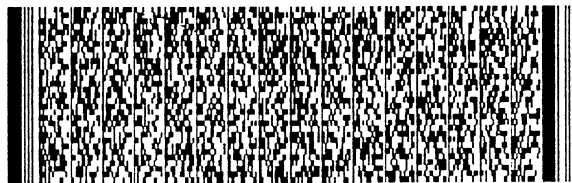
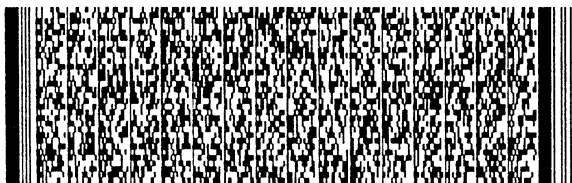


五、發明說明 (15)

的電流。一旦將試樣覆蓋在電極上就強加電位，或是在短暫的延遲之後強加，通常是大約3秒，以便確保藉著試樣徹底地濕潤電極。直到取得作為信號的電流或電流積分為止的固定時間，應該長得足以確保影響所觀察到之電流的主要變數，是分析物之濃度。

參考電極/反電極可以是傳統的銀/氯化銀電極，但也可以在結構上像工作電極一樣。在一個具體實施例中，可利用在含有含水媒劑之黏合劑和填料中的適當酵素、輔因子和中介體之調配物，來塗覆兩個分開的導電軌道，而產生塗膜。在其中塗膜不導電的這些案例中，例如當填料為非導體時，共同塗膜可覆蓋兩個電極。當將電位施加在一個電極上時，藉著吸收在另一個工作電極處釋放的電子，將具有像參考/反電極一樣的功能。由於利用在其電極處之電子流的交互作用的結果，在參考/反電極的中介體將簡單地變成還原狀態。

藉著利用黏合劑和填料成份來調配工作電極，獲得產生想要行為的反應層。目標是容許試樣與酵素、輔因子和中介體產生交互作用，但亦要確保這些具有化學活性的成份依然與電極的表面緊鄰。黏合劑成份應包括迅速增加液態介質之黏性，並促進薄膜或薄層形成的物質。這樣物質的代表為多醣類，像是瓜耳樹膠、藻酸鹽、刺槐豆膠、角叉菜膠和黃色素。也有幫助的是通常已知為成膜劑的物質，像是聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯、乙酸纖維素、羧甲基纖維素和聚(乙烯基噁唑啉酮)。填料成份應為顆粒狀物



五、發明說明 (16)

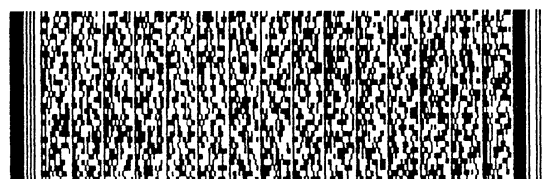
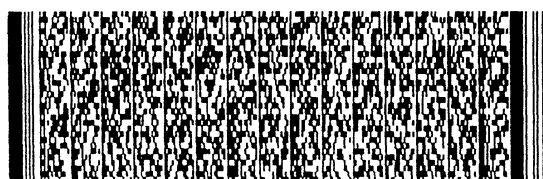
質，其對在測量中涉及的氧化還原反應在化學上是惰性的，並且不溶於含水介質。它可以是導電的或不導電的。代表性的物質包括碳，通常是以石墨、二氧化鈦、矽土和礬土之形式。

活性電極可藉著在含水媒劑中調配酵素、輔因子、中介體和黏合劑及填料，並將其塗抹在具有導電軌道之延長、電絕緣之載體上而便利地產生。可藉著諸如網印之類的印刷，或其他適當的技術來應用該調配物。該調配物亦可包括其他成份，如緩衝溶液，以便在加工期間保護酵素，蛋白質穩定劑，以便保護酵素對抗變性作用，以及去沫劑。這些額外的成份亦可對反應層的特性有影響。

工作電極通常具有在大約2到50微米之間的乾厚度，較佳的是在大約10到25微米之間。確實的乾厚度將依據塗抹製造工作電極之成份所使用的應用技術，而到某種的程度。例如在大約10到25微米之間的厚度，通常是使用網印。

然而，反應層的厚度不僅是工作電極之乾厚度的函數，亦依賴該試樣對工作電極的影響。在含水試樣的案例中，工作電極成份的調配物將影響該層表現之水攝取的程度。

填料通常構成在大約20到30重量%的含水媒劑。其他成份的量通常低於大約1重量%的含水媒劑，並憑經驗調整，以便達到想要的最終性質。例如，調整緩衝溶液和蛋白質穩定劑的量，達到想要程度的殘餘酵素活性。關於此點，可使用較多的酵素和較少的穩定劑，或是較少的酵素和較



五、發明說明 (17)

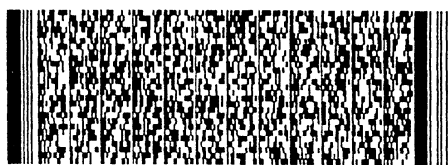
多的穩定劑，以便達到相同的最終程度之酵素活性。應調整黏合劑和去沫劑的含量，得到就應用方法而言最適當的黏度，較高的黏度適合網印，而較低的黏度適合凹版印刷。

可根據表2來調製適當的含水墨水調配物，使去沫劑、緩衝溶液、酵素活性促進劑和水保持平衡，調合1克的調配墨水。

表2

酵素(像是葡萄糖脫氫酶或3-羥基丁酸鹽脫氫酶)	200至4000單位
菸鹼醯胺輔因子(像是NAD)	5至30重量%
中介體(像是1,10-啡啉苯醌)	0.1至1.5重量%
填料(像是超細的碳或二氧化鈦)	10至30重量%
黏合劑(像是藻酸鹽或瓜耳樹膠)	0.01至0.5重量%
蛋白質穩定劑(像是海藻糖或牛血清白蛋白)	0.01至2重量%

可利用帶有各種時間延遲的循環伏安法，輕易地評估反應層的穩定性。藉著將工作電極調配物暴露在含有相對上較高濃度之分析物的試樣下，並使其接受度斷增加之電位至最大值，然後不斷地降低電位至回到未施加電位，來評估之。所得的電流增加至高峰值，然後減少，如同電壓連續掃描。在將工作電極暴露於試樣下後，在各種延遲的期間之後，經營這類的循環伏安法評估。在逐漸延長延遲時

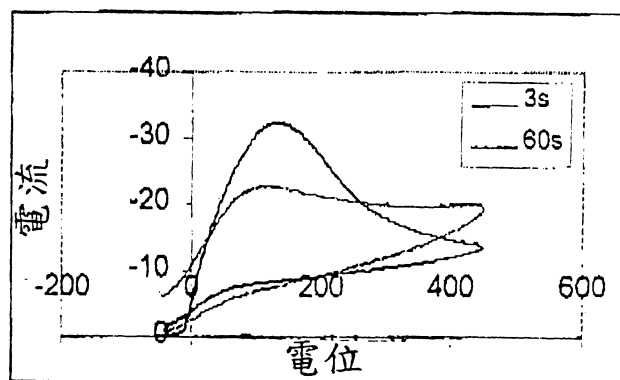


五、發明說明 (18)

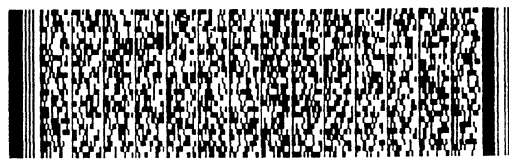
間的高峰電流中的變化，為反應層之穩定性的測量值。反應層越穩定則高峰電流的降低就越少。

經營評估來比較根據本發明之教導來調製的工作電極，和根據Geng等人，在Biosensors and Bioelectronics第II冊，第12號(1996)的第1267至1275頁之教導調製的"工作電極"。按照上文的教導，將代表本發明之工作電極調製成帶有大約25重量%的填料(超細的碳)、黏合蛋白質穩定劑和去沫劑，並按照Geng論文第1267頁中的描述來調製帶有高分子量聚(環氧乙烷)之代表Geng的工作電極。在每個案例中，係在將工作電極暴露在20mM葡萄糖水溶液中3秒和60秒之後，以每秒50毫伏特之掃描速率升高至400mV，對銀/氯化銀參考電極，來施加電位。根據本發明之調配物產生穩定的反應層，其中在60秒之後的高峰電流為在3秒後的60%，而根據Geng論文的調配物產生不穩定的反應層，其中在60秒的暴露之後沒有可觀察的高峰電流。

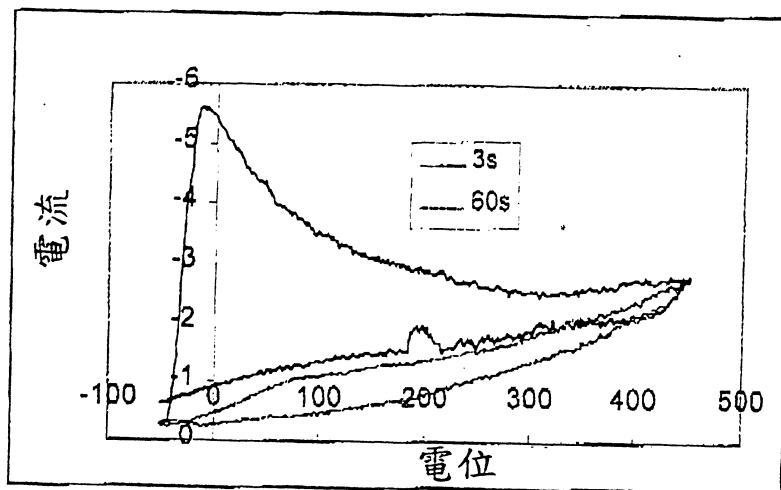
這係歸因於電極的溶解，喪失試劑在大量的溶液中。個別的伏安圖如下：



帶有黏合劑和填料的調配物(本發明)



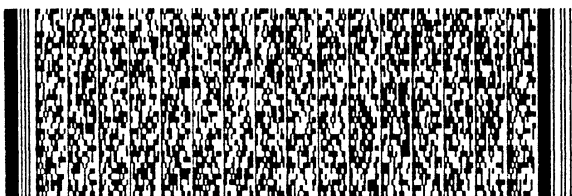
五、發明說明 (19)



PEO調配物(Geng 論文)

本發明之試驗條可檢測屬於NAD-或NADP-依賴性脫氫酶酵素之受酶質的分析物，係利用選自在本文中揭示之化合物的中介體，像是1,10-PQ。

企圖使本發明之試驗條可供電子裝置和計量系統使用。這些控制電化學反應的進行(例如藉著在電極處維持特定的電位)，監視該反應，並計算和顯示其結果。在計量系統中想要的特定特徵為使用能夠檢測以試樣液體弄濕之反應帶的這類試驗條，因此容許適時地開始測定，並降低由使用者錯誤所引起之不正確的可能。可藉著在將該試驗條一插入計量器中，便開始施加電位於該條的電極上；該電位可在短時間內移開，以便容許在開始測定之前完全弄濕，而達成該目的。



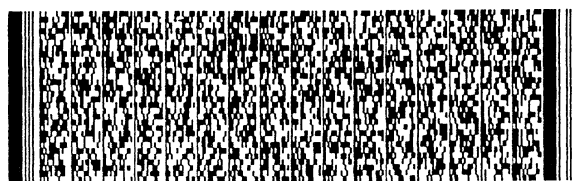
五、發明說明 (20)

計量器之特徵亦可以是自動辨認測定不同分析物之試驗條的工具。例如，這可藉著一或多個可印在試樣條上的電路環來完成；每個環可依據該條類型的特徵來提供電阻，如同在美國專利第5,126,034號，第4冊，第3至17行中的描述。另外，亦可在試驗條的近端內切割V字形刻痕或其他形狀；在該計量器中的開關或光學檢測器可檢測每個V字形刻痕的出現或無。其他的試驗條-類型辨認技術包括改變試驗條的顏色，並對計量器提供能夠區別顏色範圍的光檢測器；並對試驗條提供條碼、磁條或其他標記，並對計量器提供適當的讀取計劃。

在一個大規模產製試驗條的實例中，試驗條電極具有兩個電極之構型，包括參考/反電極和工作電極。可由任何具有電絕緣表面的材料來製造載體，包括聚(乙烯氣)、聚碳酸酯，聚酯、紙、卡紙紙板、陶瓷、陶瓷塗覆的金屬、這些材料的混合物(例如聚碳酸酯和聚酯的混合物)，或其他絕緣的物質。

藉著諸如網印之類的沉積法，將導電墨水塗抹在載體上。該層形成接觸區，其容許計量器與試驗條形成界面，並在接觸點和出現在該條上的活性化學物質之間提供電路。例如，該墨水可以是風乾的、以有機物為基底的碳混合物。其他可供選擇的調配物包括以水為基底的碳墨水，以及金屬墨水，如銀、金、鉑和鈮。其他乾燥或固化的方法包括使用紅外線、紫外線和放射線-頻率的照射。

以含有銀/氯化銀混合物之有機溶劑為基底的墨水，來



五、發明說明 (21)

印刷形成參考/反電極的層。另外的參考配對包括Ag/AgBr、Ag/AgI和Ag/Ag₂O。印刷部份延伸至覆蓋延伸進入反應帶之碳印刷的中間軌道。如果使該印刷的分離部份延伸至覆蓋另一個在反應帶以外之碳軌道的部份，可用來降低每個軌道的總電阻。

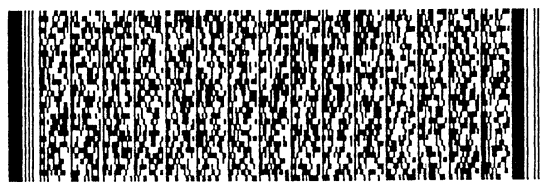
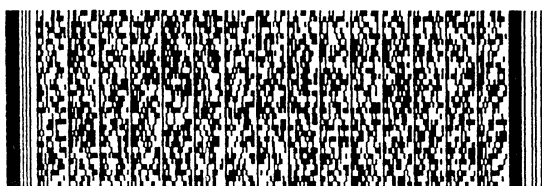
可視需要印刷一層介電墨水，覆蓋大部份已經印好的碳和銀/氯化銀層。在該案例中，兩區保持無遮蔽的，那就是電接觸區和感測區，其將位於反應帶之下，如圖1和2中所示。該印刷限定了反應帶的範圍，並保護暴露軌道免於短路。

關於工作電極，在反應帶中二個導電軌道的頂部上的限定區中，沉積一或多種墨水至正確的厚度，以便沉積酵素、輔因子和本發明之中介體。藉著網印可便利地進行之。其他放置該墨水的方法包括注墨印刷、體積分配、照相凹版印刷、苯胺印刷(flexography)和凸版印刷。可視需要將第二個部份具有活性的墨水沉積在第二個導電軌道上，形成假電極。

可視需要在墨水調配物中含有多醣類。適當的多醣類包括瓜耳樹膠、藻酸鹽、刺槐豆膠、角叉菜膠和黃色素。墨水亦可包括成膜劑；適當的成膜聚合物包括聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯、乙酸纖維素、CMC和聚(乙烯基噁唑啉酮)。墨水填料包括二氧化鈦、砂土、礬土或碳。

下列的是實行本發明之解釋、而非限制的實例。

實例1



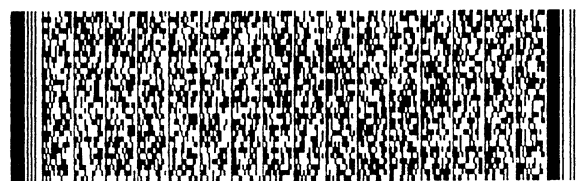
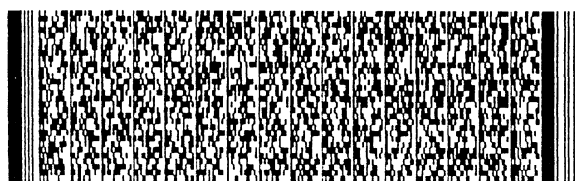
五、發明說明 (22)

中介體：

從Polysciences, Inc. 獲得半-ZnCl₂ 鹽形式的麥爾多拉藍(Meldola's Blue)。從Sigma購得2,6-二氯靛酚(DCIP)和Tris緩衝溶液。從ICN Biomedicals, Ltd. 提供的錠劑來製備磷酸緩衝之生理鹽水(PBS)溶液(Dulbecco's 配方)。

從Toyobo Co., Ltd. 購得得自假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.) 之D-3-羥基丁酸鹽脫氫酶(HBDH; EC 1.1.1.30)。由Boehringer Mannheim提供對-菸鹼醯胺腺嘌呤核苷酸(NAD⁺)和D,L-3-羥基丁酸。

根據Gillard等人的方法(J. Chem. Soc. A, 1447-1451, 1970)來製備1,10-啡啉苯醌(1,10-PQ)。利用由Eckert等人描述的程序(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 2533-2536, 1982)來合成1,7-啡啉苯醌(1,7-PQ)。按照Mullins等人的揭示(J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 75-81, 1996), 以新亞銅試劑之硝化作用副產物的形式來合成2,9-二甲基-1,10-啡啉苯醌(2,9-Me₂-1,10-PQ)。經由改編自Surrey描述的方法(Org. Synth. Coll. 第3冊, 編輯E.C. Horning, Wiley, New York, 753-756)的1-甲氧基啡啉之甲基化作用, 來製備1-甲氧基啡啉甲基硫酸酯(1-MeO-PMS)。藉著按照Yoshioka (Yakugaku Zasshi, 73: 23-25, 1953)之報告來修改的Wohl-Aue反應, 合成1-甲氧基啡啉。根據Carlson的共同程序(J. Am. Chem. Soc. 107: 479-485, 1985), 經由4-甲基兒茶酚與鄰-四



五、發明說明 (23)

氯醌的氧化作用，來製備4-甲基-1,2-苯醌(4-Me-BQ)。按照Goss等人的報告(Inorg. Chem. 24 : 4263-4267, 1985)，從 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ (Strem Chemicals. Inc) 獲得1,10-PQ複合物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(1,10\text{-PQ})](\text{PF}_6)_2$ 。

製備1-Me-1,10-啡啉苯醌三氟甲烷磺酸酯(1-Me-1,10-PQ⁺)：

在氮氣下，將三氟甲烷磺酸酯(Aldrich)(1.0毫升)加至在無水二氯甲烷(25毫升)中之1,10-PQ(0.50克，2.38毫莫耳)溶液中。立刻發生沉澱，並攪拌所得的混合物24小時。過濾接著以二氯甲烷沖洗，得到細粒黃色粉末狀之1-Me-1,10-PQ⁺(0.65克，73%)。

在乾式條中評估作為NADH中介體之麥爾多拉藍和1,10-PQ：

以3.5毫克/克的量，從含有NAD(P)H中介體之有機碳墨水來產製合併有1,10-PQ和MB的網印電極。將固體中介體混合到商業處理的碳墨水(Gwent Electronic Materials)中。

在圖3中顯示在對抗印刷Ag/AgCl參考電極之+400mV的平衡電位下，利用在PBS中之含水NADH溶液(0-16.7 mM)，來測試含有1,10-PQ之電極的劑量反應曲線。記錄0.58 A mM⁻¹ NADH之斜率。在圖4中顯示在對抗印刷Ag/AgCl參考電極之+100mV的平衡電位F，利用含水的NADH溶液(0-12.4 mM)，來測試含有MB之電極的劑量反應曲線。觀察到增加的8.48 A mM⁻¹ NADH之斜率。



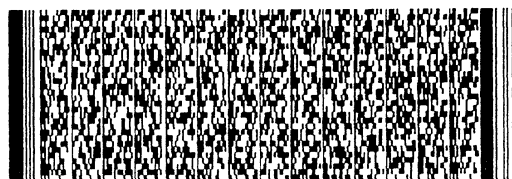
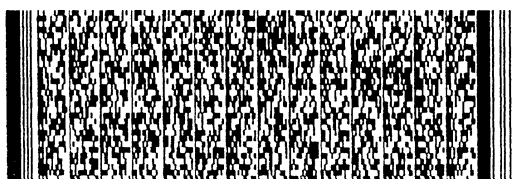
五、發明說明 (24)

評估中介體對D-3-羥基丁酸鹽脫氫酶的抑制作用：

製備一系列共18種溶液(各2.5毫升)，分別含有50單位/毫升HBDH，以及在Tris緩衝溶液(50 mM，pH8.2)中之1.29或2.58毫克下列的NAD(P)H中介體：MB、4-Me-BQ、1-MeO-PMS、DCIP、1,10-PQ、1,7-PQ、2,9-Me₂-1,10-PQ、1-Me-1,10-PQ⁺和[Ru(bpy)₂(1,10-PQ)](PF₆)₂。亦製備含有酵素但沒有中介體的對照組溶液。在37℃下培養該溶液0.5小時，然後利用Sigma Diagnostics D-3-羥基丁酸鹽工具組，在340毫微米處測定NADH(作成一式三份)。與對照組相比較，加入中介體對測定速率的干擾程度，提供了中介體作為NADH之氧化劑之效力的定量測量。

然後藉著在微量離心濾器(Millipore)上，通過聚砜膜(名義上切開的分子量為：30,000)過濾，再從中介體溶液中分離出酵素。將保留在濾器上的酵素溶解於Tris緩衝溶液(0.2毫升)中，再利用Sigma工具組測定所得的溶液(作成一式三份)。藉著比較在過濾之前和之後的測定結果，可定出任何共價及/或不可逆結合之中介體對酵素活性的影響。

將在過濾之前和之後，對每種溶液之兩種測定的結果，收集在表3中。

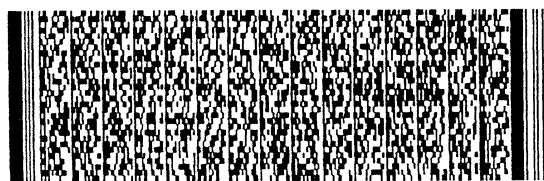


五、發明說明 (25)

表3

中介體	測定速率(吸光度單位/分鐘)		
	對照組(無中介體)	過濾之前	過濾之後
1, 10-PQ	0.167	0.149	0.160(96%)
1, 7-PQ	0.155	0.115	0.150(97%)
MB	0.167	0.008	0.026(16%)
4-Me-BQ	0.170	0.005	0.007(4%)
1-MeO-PMS	0.150	0.009	0.071(47%)
DCIP	0.150	0.104	0.085(57%)
2, 9-Me ₂ -1, 10-PQ	0.197	0.189	n/a
1-Me-1, 10-PQ ⁺	0.197	0.150	0.185(94%)
[Ru(bpy) ₂ (1, 10-PQ)](PF ₆) ₂	0.197	0.114	0.193(98%)

雖然這些結果證實啡啉苯醌與麥爾多拉藍和1-MeO-PMS相比較，是相對上較無能的NADH中介體(也就是測定速率"在過濾之前"被壓低至較少的程度)，但是在"過濾之後"，對於含有1, 10-PQ、1, 7-PQ、1-MeO-1, 10-PQ或[Ru(bpy)₂(1, 10-PQ)](PF₆)₂之溶液，歸還了90%以上的原始酵素活性。這並不包括MB、1-MeO-PMS、DCIP或4-Me-BQ之案例。確實，苯醌中介體4-Me-BQ證實是最有效的抑制劑，在"過濾之後"僅有4%的原始活性殘留。因此，後四個中介體使HBDH部份失活，而新近描述的中介體對酵素活



五、發明說明 (26)

性，有利地僅有少量或沒有影響。

每種中介體之殘留酵素活性的百分比，在圖5中以柱狀圖表示，其顯示本發明之中介體，以黑柱表示，並非HBDH的強抑制劑。相反的，MB、4-Me-BQ、1-MeO-PMS和DCIP全部不可逆地抑制HBDH，並伴隨著有從43到96%之範圍的活性喪失；這些結果在圖5中以灰柱表示。

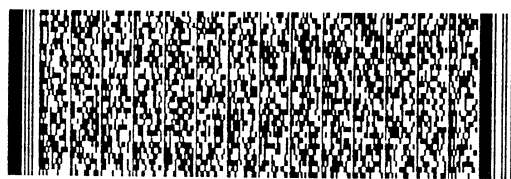
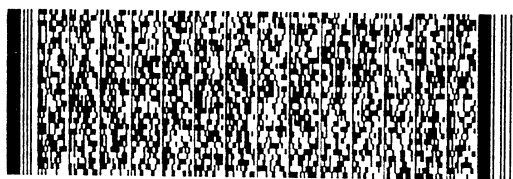
實例2

在含有HBDH之乾式條中，評估麥爾多拉藍和1,10-PQ

由分別併入2.4或4.3毫克/克墨水之1,10-PQ或MB的含水碳墨水，與酵素HBDH(120單位/克墨水)和 NAD^+ (110毫克/克墨水)一起，來產製網印的電極。該墨水亦含有多糖黏合劑。

在圖6中提供含有1,10-PQ之電極的劑量反應曲線。在儲存(30°C，脫水乾燥)4、14和26週之後，在對抗印刷Ag/AgCl參考電極之+400mV的平衡電位下，利用在PBS中之含水的D-3-羥基丁酸鹽溶液(0-25mM)，來測試含有1,10-PQ之電極的劑量反應曲線。三個劑量反應全都是非線性的，並在24mM D-3-羥基丁酸鹽之處，記錄在對準之外的8.5A電流。這證實脫水電極的反應，在至少26週之後仍是穩定的。

在圖7中提供含有MB之電極的劑量反應曲線。在儲存(30°C，脫水乾燥)2至14週之後，在對抗印刷Ag/AgCl參考電極之+100mV的平衡電位下，利用在PBS中之含水的D-3-羥基丁酸鹽溶液(0-28mM)，來測試該電極的劑量反應曲線。



五、發明說明 (27)

劑量反應曲線類似在圖4中的那些。在儲存2週之後，關於這些電極，在24mM D-3-羥基丁酸鹽之處，記錄到8.6A之電流。這幾乎與從含有1,10-PQ之脫水條中獲得的反應相同。

該結果證實諸如MB之類化合物能夠利用NADH非常有效地調節，藉著其抑制HBDH之事實，更勝過1,10-PQ。而且，經由藉著MB使HBDH失活，連累了電極對D-3-羥基丁酸鹽反應的穩定性。圖7顯示在14週的儲存之後，藉著大約7%不被接納的邊緣而降低了這些電極的反應。

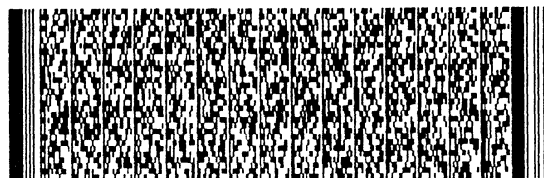
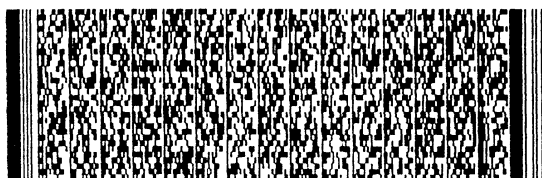
總括而言，含有本發明之中介體的生物感測器電極顯示在至少26週的儲存之後，反應仍是穩定的。相反的，那些合併傳統中介體的電極，像是MB，其為不可逆的酵素抑制劑，顯示反應僅在14週的儲存之後便會減退。

實例3

在含有葡萄糖脫氫酶(GDH)的乾式條中評估1,10-PQ：

由分別併入2.4或4.3毫克/克墨水之1,10-PQ或MB的含水碳墨水，與酵素葡萄糖脫氫酶(120單位/克墨水)和 NAD^+ (110毫克/克墨水)一起，來產製網印的電極。該墨水亦含有多糖黏合劑。

在圖8中提供該電極之校準劑量反應曲線。利用含有範圍在3.3至26mM葡萄糖之生理濃度的全血來測試電極。維持對抗印刷Ag/AgCl電極之+50mV的平衡電極。電極產生在葡萄糖範圍之上的線性反應。因此，其證實可使用本發明之中介體來建造以特低應用電位來操作之在臨床上有用的



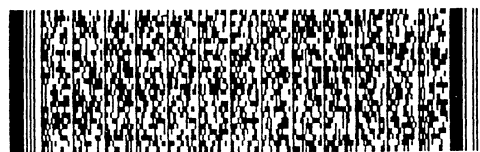
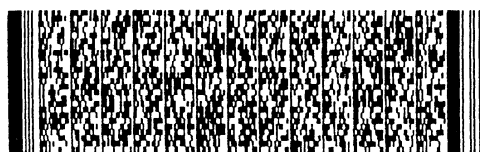
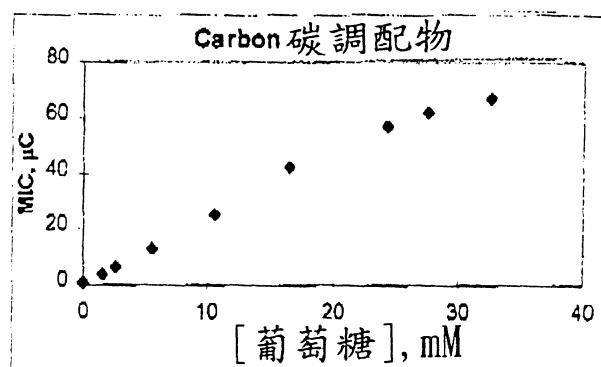
五、發明說明 (28)

葡萄糖感測器。

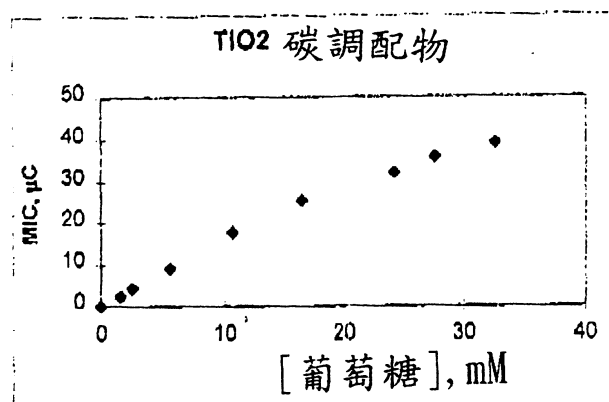
實例4

利用在圖1和2中說明並帶有銀/氯化銀之參考/反電極的構築體，以及藉著以根據表2之調配物來網印所製備的工作電極，來製備電極條。在一個案例中，填料為25重量%之超細碳，而在另一個案例中，填料為25重量%的鈦。在這兩個案例中，酵素為葡萄糖脫氫酶(GDH)，輔因子為NAD，中介體為1,10-PQ，黏合劑為瓜耳樹膠，蛋白質穩定劑為牛血清白蛋白(BSA)，且緩衝溶液為Tris (.325重量%)。

藉著在參考/反電極到工作電極之間施加200mV電位，來評估這些電極條，同時以含水的葡萄糖溶液覆蓋兩種電極。將在施加電位之後15至20秒時觀察到電流積分，並對受試溶液的葡萄糖濃度作圖。填充碳的調配物得到每mM葡萄糖2.6微庫倫的斜率，且X軸截取-1微庫倫，而填充鈦的調配物得到每mM葡萄糖1.5微庫倫的斜率，且X軸截取0.6微庫倫。作圖如下：



五、發明說明 (29)



其他的具體實施例

將明瞭已經描述本發明，連同其詳細說明一起，先前的說明企圖解釋而非限制本發明之範圍。其他的觀點、優點和修改亦在本發明的範圍內。



附頁

表1

1.1.1.1	酒精脫氫酶
1.1.1.27	乳酸鹽脫氫酶
1.1.1.31	3-羥基丁酸鹽脫氫酶
1.1.1.49	葡萄糖-6-磷酸脫氫酶
1.1.1.47	葡萄糖脫氫酶
1.2.1.46	甲醛脫氫酶
1.1.1.37	蘋果酸鹽脫氫酶
1.1.1.209	3-羥基類固醇脫氫酶

表2

酵素(像是葡萄糖脫氫酶或3-羥基丁酸鹽脫氫酶)	200至4000單位
菸鹼醯胺輔因子(像是NAD)	5至30重量%
中介體(像是1,10-啡啉苯醌)	0.1至1.5重量%
填料(像是超細的碳或二氧化鈦)	10至30重量%
黏合劑(像是藻酸鹽或瓜耳樹膠)	0.01至0.5重量%
蛋白質穩定劑(像是海藻糖或牛血清白蛋白)	0.01至2重量%

附頁

表3

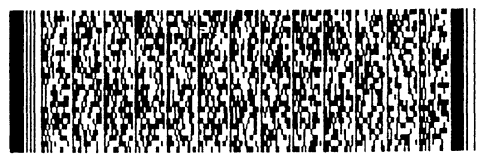
中介體	測定速率(吸光度單位/分鐘)		
	對照組(無中介體)	過濾之前	過濾之後
1, 10-PQ	0.167	0.149	0.160(96%)
1, 7-PQ	0.155	0.115	0.150(97%)
MB	0.167	0.008	0.026(16%)
4-Me-BQ	0.170	0.005	0.007(4%)
1-MeO-PMS	0.150	0.009	0.071(47%)
DCIP	0.150	0.104	0.085(57%)
2, 9-Me ₂ -1, 10-PQ	0.197	0.189	n/a
1-Me-1, 10-PQ ⁺	0.197	0.150	0.185(94%)
[Ru(bpy) ₂ (1, 10-PQ)](PF ₆) ₂	0.197	0.114	0.193(98%)

四、中文發明摘要 (發明之名稱：用於輔因子之再產生之生物感測器電極中介體)

本發明係以 NAD^+ 和 NADP^+ 中介體化合物的發現為基礎，其在細胞內脫氫酶酵素之活性部位並非以不可逆之方式與硫醇基團結合。這類中介體化合物避開了酵素抑制的常用模式。因此該中介體可在由 NAD- 或 NADP- 依賴性酵素建構之電流分析電極中，增加電反應的穩定性和可靠性。

英文發明摘要 (發明之名稱：BIOSENSOR ELECTRODE MEDIATORS FOR REGENERATION OF COFACTORS)

The present invention is based on the discovery of NAD^+ and NADP^+ mediator compounds that do not bind irreversibly to thiol groups in the active sites of intracellular dehydrogenase enzymes. Such mediator compounds avoid a common mode of enzyme inhibition. The mediators can therefore increase the stability and reliability of the electrical response in amperometric electrodes constructed from NAD- or NADP- dependent enzymes.



圖式

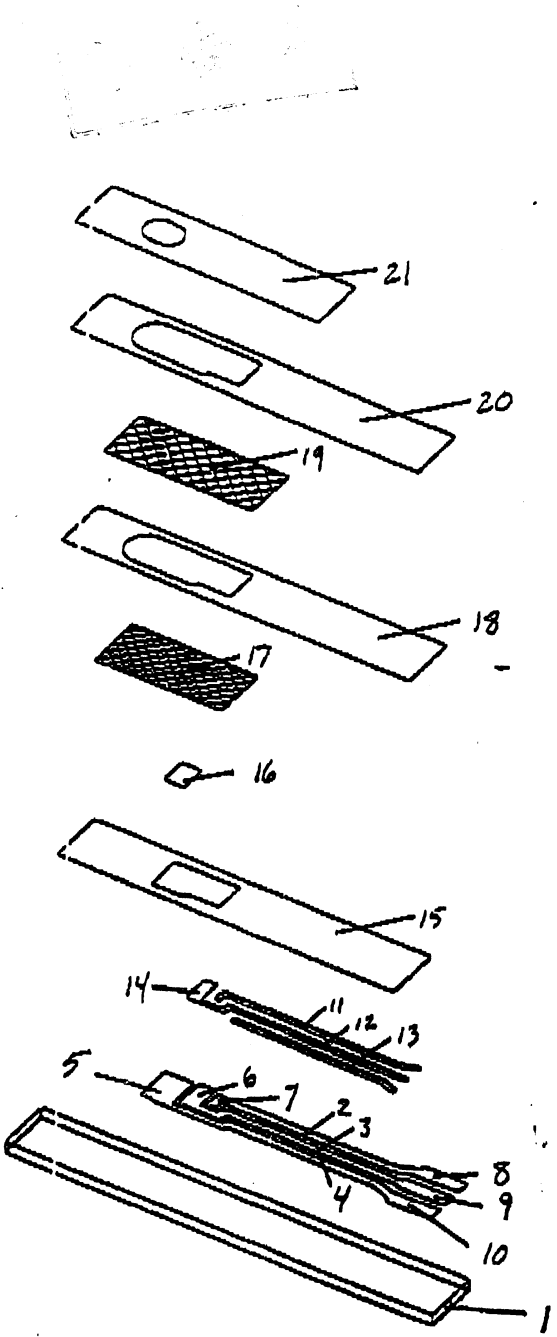


圖 1

圖式

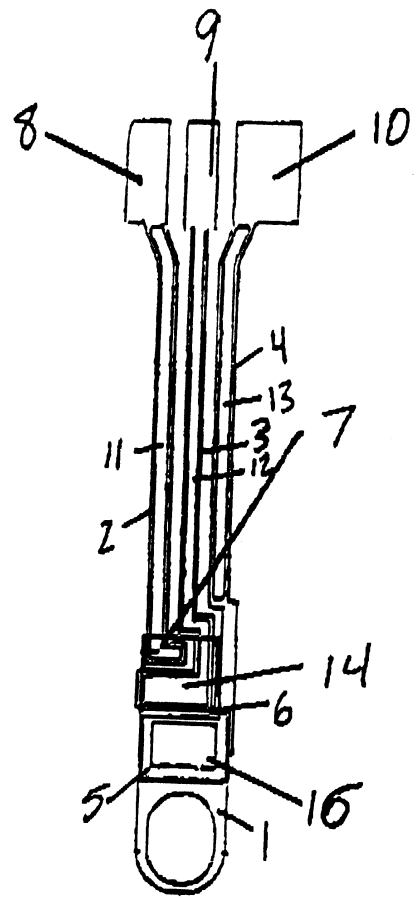


圖 2

圖式

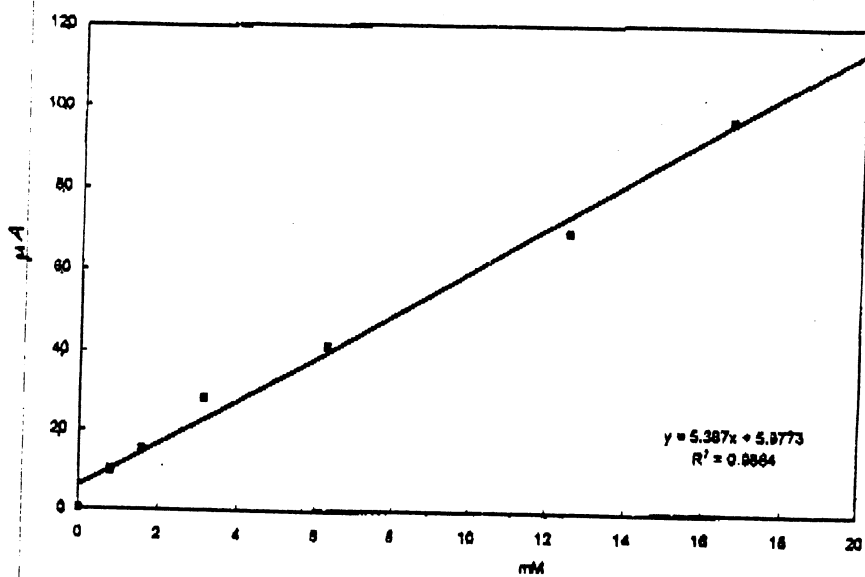


圖 3

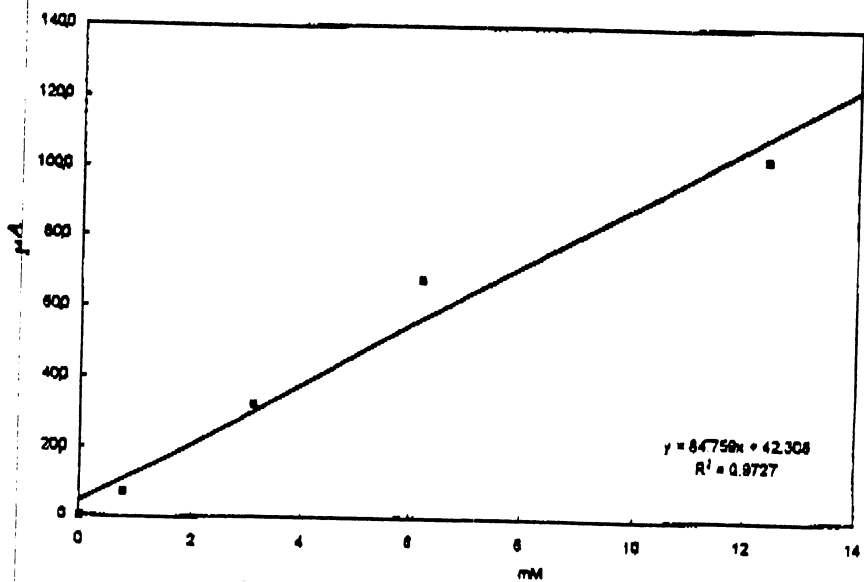


圖 4

圖式

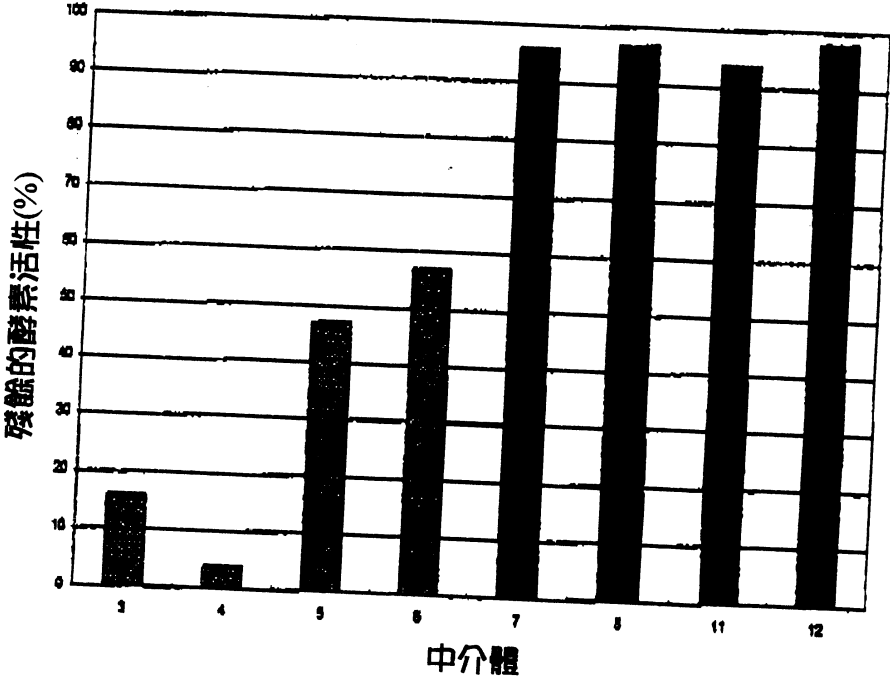


圖 5

圖式

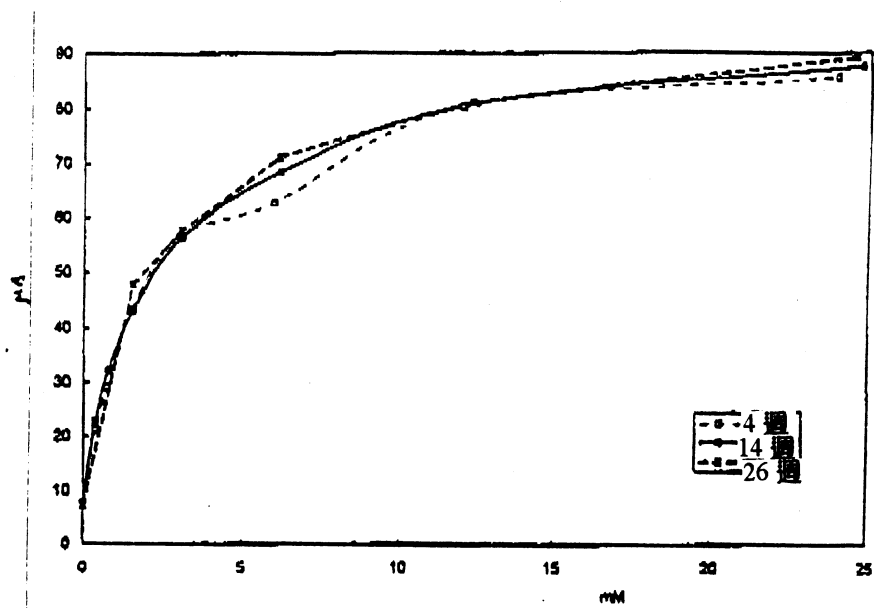


圖 6

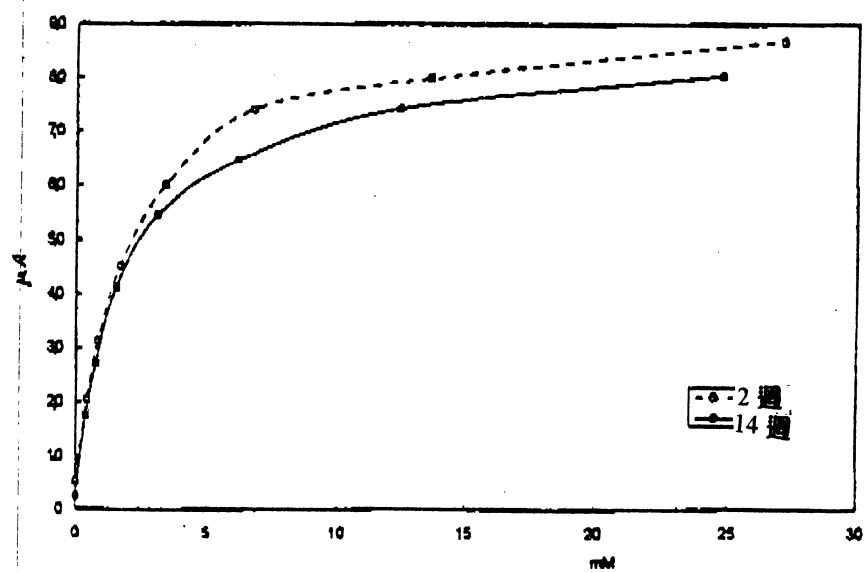


圖 7

圖式

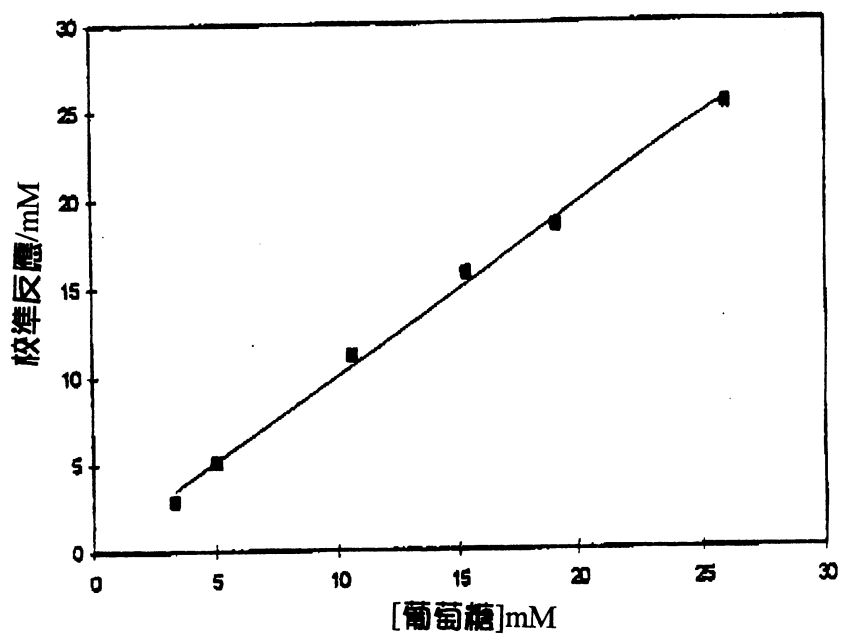


圖 8

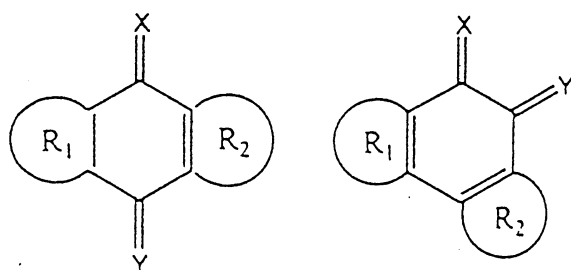
五、發明說明 (2)

乙醯鹽在Cys₁₄₉處以化學計算之方式將補充醯-3-磷酸脫氫酶(EC 1.2.1.9)烷基化，隨即喪失催化劑活性。此外，已知可藉著硫醇試劑不可逆地抑制酵素葡萄糖脫氫酶、D-3-羥基丁酸鹽脫氫酶(HBDH)和乳酸鹽脫氫酶。因此嘗試發展含有NAD-或NADP-依賴性脫氫酶的穩定生物感測器，必須避開對硫醇有反應性的化合物，因為它們可作為酵素抑制劑。

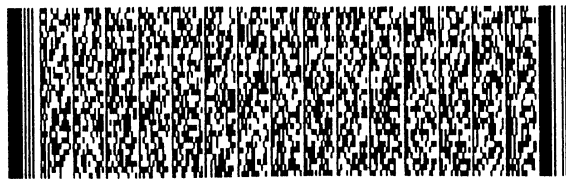
發明概述：

本發明係以NAD⁺和NADP⁺中介體化合物的發現為基礎，其在細胞內脫氫酶酵素之活性部位並非以不可逆之方式與硫醇基團結合。這類中介體化合物避開了酵素抑制的常用模式。因此該中介體可在由NAD-NADP-依賴性酵素建構之電流分析電極中，增加電反應的穩定性和可靠性。

在一個具體實施例中，本發明的特徵為電流分析生物感測器之試驗元件。該元件包括電極，具有分布於其上的試驗試劑。試驗試劑包括菸鹼醯胺輔因子-依賴性的酵素，菸鹼醯胺輔因子和具有下式之一的中介體化合物：



其中X和Y可分別為氧、硫、CR³R⁴、NR³或NR³R⁴⁺；R₁和R₂可分別為經取代或未經取代之芳香族或雜芳香族；且R³和R⁴



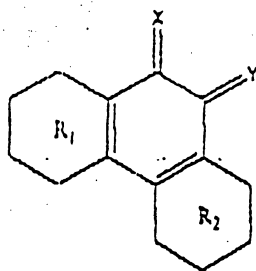
六、申請專利範圍

1. 一種單次使用可拋棄式的電極條，其附接在感測器系統的信號讀出電路組件上，以便檢測在含水試樣中代表分析物的電流，該條包括：

a) 延長的支撐物，具有大體上平坦的、平面的表面，改裝成以可釋放之方式附接在該讀出電路組件上；

b) 第一個導體，沿著該表面延伸，並包括連接該讀出電路組件之導電元件；

c) 活性電極，在該表面上與該第一個導體接觸，該活性電極包括菸鹼醯胺輔因子-依賴性酵素，菸鹼醯胺輔因子，和具有下式之中介體化合物：



其中X和Y可分別為氧、硫；R₁和R₂可分別為具有1個氮原子之6-員未經取代之苯基；

其中將該活性電極調製成帶有填料和黏合劑成份，以便在以動力學模式進行測定時，使該電極對在1到8mM之間的該分析物濃度得到單調的反應，其中在該測定期間同時發生該中介體的氧化和還原作用；

d) 第二個導體，沿著該表面延伸，包括與該讀出電



六、申請專利範圍

路組件連接的導電元件；

e) 與該第二個導體接觸的參考/反電極；

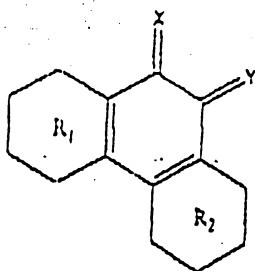
f) 將該導體分隔開，使其不能以電接觸，並在將該含水試樣放置在該條上時，以不使其成為電接觸的方式來配置；

g) 配置該活性電極和該參考/反電極，使得兩者可同時被一小滴該含水試樣覆蓋，以便在該電極之間提供導電通路。

2. 一種藉著 NAD(P)^+ 依賴性酵素使在含水試樣中之分析物接受氧化作用以測定其濃度之方法，包括：

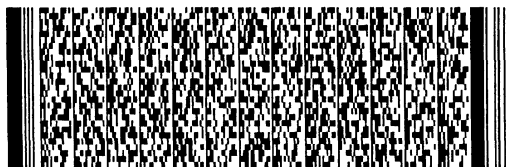
a) 在 NAD(P)^+ 的存在下，利用 NAD(P)^+ 依賴性酵素將該分析物氧化；

b) 利用具有下式之中介體，將藉著該分析物與 NAD(P)^+ 依賴性酵素之反應所產生的 NAD(P)H 氧化：



其中X和Y可分別為氧、硫； R_1 和 R_2 可分別為具有1個氮原子之6-員未經取代之苯基；且

c) 在電極上施加電位，以便再氧化在氧化 NAD(P)H 時



六、申請專利範圍

被還原的中介體化合物，並觀察所得的電流，

其中有些中介體化合物藉著與NAD(P)H的反應而被還原，而有些中介體化合物藉著在測量期間轉移電子至該電極而被氧化，且在整個該測量期間該中介體化合物氧化的速率，和結果觀察到所得的電流，與分析物在該試樣中的濃度有單調的關係；

將該NAD(P)⁺依賴性酵素、NAD(P)⁺和中介體化合物，與黏合劑和填料一起混合，已塗抹在該電極的表面上；及在測量期間所觀察到的電流，與在試樣中之分析物的濃度成線性關係。

3. 根據申請專利範圍第1項之電極條，其中該中介體化合物為1,10-啡啉苯醌。

4. 根據申請專利範圍第3項之電極條，其中該輔因子-依賴性酵素為葡萄糖脫氫酶。

5. 根據申請專利範圍第3項之電極條，其中該輔因子-依賴性酵素為3-羥基丁酸鹽脫氫酶。

6. 根據申請專利範圍第2項之方法，其中該中介體為1,10-啡啉苯醌。

7. 根據申請專利範圍第6項之方法，其中該輔因子-依賴性酵素為葡萄糖脫氫酶。

8. 根據申請專利範圍第6項之方法，其中該輔因子-依賴性酵素為3-羥基丁酸鹽脫氫酶。

9. 根據申請專利範圍第2項之方法，其中所施加之電壓為200mV或更低。

