

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101339154 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200710127590. 4

US 6241863 B1, 2001. 06. 05,

(22) 申请日 2007. 07. 05

CN 1523346 A, 2004. 08. 25,

(73) 专利权人 五鼎生物技术股份有限公司

审查员 黄斌

地址 中国台湾

(72) 发明人 陈思豪 林志生 陈冠廷 林岳晖

沈燕士

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 孟锐 臧慧敏

(51) Int. Cl.

G01N 27/30 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6491803 B1, 2002. 12. 10,

US 5837454 A, 1998. 11. 17,

CN 1908665 A, 2007. 02. 07,

CN 2662241 Y, 2004. 12. 08,

TW 416005 B, 2000. 12. 21,

CN 1525163 A, 2004. 09. 01,

US 4945045 A, 1990. 07. 31,

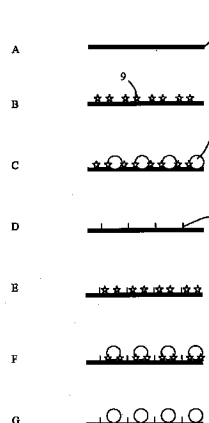
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 6 页

(54) 发明名称

复合修改电极试片

(57) 摘要

本发明涉及一种用于测量电化学信号的表面经修改的电极试片, 其中所述电子信号由纳米尺寸金粒子层与脂溶性电子介质层协同放大。本发明还提供含有所述电极试片的生物传感器。



1. 一种用于测量电化学信号的表面经修改的电极试片,其包含:  
平板绝缘基材;  
具有导电膜的电极系统,其中所述导电膜涂覆在所述平板绝缘基材的一面上,以形成分离且不相连接的工作电极与参考电极;  
涂布在所述平板绝缘基材上的电绝缘层,其部分覆盖所述电极系统,使所述电极系统未被所述电绝缘层覆盖的部分分别形成包含工作电极和参考电极的接线端和电化学反应端;  
纳米尺寸金粒子层,其至少部分覆盖所述工作电极的电化学反应端;以及  
脂溶性电子介质层,其至少部分覆盖所述工作电极的电化学反应端。
2. 根据权利要求1所述的电极试片,其中所述纳米尺寸金粒子层的金粒子尺寸为小于100 纳米。
3. 根据权利要求2所述的电极试片,其中所述纳米尺寸金粒子层的金粒子尺寸为5 到50 纳米。
4. 根据权利要求3所述的电极试片,其中所述纳米尺寸金粒子层的金粒子尺寸为13 纳米。
5. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的电极试片,其中所述纳米尺寸金粒子层完全覆盖所述电化学反应端。
6. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的电极试片,其中所述纳米尺寸金粒子层覆盖所述工作电极的电化学反应端。
7. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的电极试片,其中所述纳米尺寸金粒子层部分覆盖所述工作电极的电化学反应端。
8. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的电极试片,其中所述脂溶性电子介质层的脂溶性电子介质选自四硫富瓦烯(tetrathiafulvalene)、四氰代二甲基苯醌(tetracyanoquinodimethane)、麦尔多拉蓝(meldola blue)或二茂铁(ferrocene)或其衍生物所组成的群组。
9. 根据权利要求8所述的电极试片,其中所述脂溶性电子介质层的脂溶性电子介质是二茂铁(ferrocene)或二茂铁衍生物。
10. 根据权利要求9所述的电极试片,其中所述二茂铁衍生物是1,1'-二茂铁二羧酸(ferrocenedicarboxylic acid)。
11. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的电极试片,其中所述脂溶性电子介质层完全覆盖所述电化学反应端。
12. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的电极试片,其中所述脂溶性电子介质层覆盖所述工作电极的电化学反应端。
13. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的电极试片,其中所述脂溶性电子介质层部分覆盖所述工作电极的电化学反应端。
14. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的电极试片,其中所述工作电极的电化学反应端进一步包含架桥剂。
15. 根据权利要求14所述的电极试片,其中所述架桥剂含有双官能基,且所述官能基选自羧酸基(carboxylic acid)、硫醇基(thiol)、醇基(alcohol)、胺基(amine)和醛基

(aldehyde) 所组成的群组。

16. 根据权利要求 15 所述的电极试片,其中所述架桥剂为含醛基的化合物。

17. 根据权利要求 16 所述的电极试片,其中所述架桥剂为戊二醛 (glutaraldehyde)。

18. 根据权利要求 1 到 4 中任一权利要求所述的电极试片,其中所述工作电极中的电化学反应端进一步包含一结合元件,所述结合元件可与标的物特异性结合成复合物。

19. 根据权利要求 18 所述的电极试片,其中所述结合元件选自化合物。

20. 根据权利要求 18 所述的电极试片,其中所述结合元件选自蛋白质及核酸所组成的群组。

21. 根据权利要求 20 所述的电极试片,其中所述蛋白质是抗体、抗原、蛋白质配体或受体。

22. 根据权利要求 18 所述的电极试片,其中所述结合元件以架桥剂与所述工作电极中的电化学反应端连结。

23. 根据权利要求 18 所述的电极试片,其中所述结合元件-标的物复合物可与氧化还原酶形成氧化还原酶层。

24. 根据权利要求 23 所述的电极试片,其中所述氧化还原酶选自由葡萄糖氧化酶、葡萄糖还原酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶和过氧化氢酶所组成的群组。

25. 根据权利要求 23 所述的电极试片,其中所述氧化还原酶层包含作为所述结合元件的第一抗体、抗原标的物,和与所述抗原结合的第二抗体-氧化还原酶复合体。

26. 根据权利要求 23 所述的电极试片,其中所述氧化还原酶层包含作为所述结合元件的抗原、与所述抗原结合的第一抗体,和与所述第一抗体结合的第二抗体-氧化还原酶复合体。

27. 一种生物传感器,其包含根据权利要求 1 到 26 中任一权利要求所述的电极试片和检测装置。

28. 根据权利要求 27 所述的生物传感器,其中所述检测装置是由电压输出装置,信号接收装置,以及显示装置所组成的电流传感器。

## 复合修改电极试片

### 技术领域

[0001] 本发明涉及利用纳米尺寸金粒子层与脂溶性电子介质层协同放大用于测量电化学信号的电子信号的电极试片,和含有所述电极试片的生物传感器。

### 背景技术

[0002] 生物感测分析技术被誉为二十一世纪科技的新宠,生物传感器是应用生物感测分析技术构成的检测分析系统,是由生物识别性材料与各种信号转换器组合而成。电化学生物传感器系统特性简易,同时具有优异的灵敏度,因此成为一个绝佳的感测元件传导机制,加上生物分子间的特异性 (specificity) 关系,更可解决感测元件经常面临的选择性 (selectivity) 问题。由于生物传感器与电极试片可提供高准确度的快速检测,因此其可在研究和临床上用以处理大批的检体,其中酶-电化学传感器(例如市售的电化学血糖测量系统)就是利用电极上的葡萄糖氧化酶进行葡萄糖分子的浓度测定。酶固定化的生物传感器的演进可概分为三个发展阶段,第一阶段是利用一般溶氧感测电极感测氧化酶催化待测物过程中所消耗的溶氧,间接得知待测物浓度;另一种检测酶催化反应中具有电化学活性的产物,常见的如过氧化氢。第二阶段的运用主要为电子传递物的加入,通过电子传递物提高电子传递到电极表面的效率,同时还利用其具有氧化还原可逆的特性,接收酶催化反应所产生的电子使电子传递物质还原成还原态,并在电极表面进行氧化反应以顺利地将电子传递给电极以形成电信号,其优点为电子传递物具有较低的氧化还原电位,可降低整个感测作用所需的电位,避免因高电位所产生的其它干扰物质所造成的影响。第三阶段是运用一些具有辅助因子的酶,可加入辅助因子以降低酶催化氧化或还原反应时电子从酶传递出的阻力,最常见的辅助因子如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide ;NADH), NADH 可将电子通过可逆的氧化和还原过程将电子传递到电极上,许多研究成果显示此种方法的电子传递效率远高于前两个阶段的方法,而使传感器有较高的灵敏度,但缺点是酶固定化的制备过程繁琐,并且其在室温下的安定性不佳,不利于商品的运输与储放。

[0003] 利用抗体与抗原或双股互补或部分互补的核糖核酸或去氧核糖核酸,这些具有高选择性和亲和性作为生物分子检测设计模式,研究者可将高选择性和亲和性生物分子固定在各式传感器上,作为检测标识。所述生物分子包括(但不限于)抗体、各式抗原、酶、核酸、组织或个体细胞。因此,可选用抗原、抗体与电化学装置的组合,其原理与传统固相免疫分析法相似,但抗体或抗原固定在传感器的表面,通过固定相分子与其相对应的流动相分子结合,用来检测抗体与抗原间的交互作用,并以传感器中的转换器扩大可检测的电信号来进行定量分析,此装置称为免疫电化学传感器。

[0004] 酶标定式的免疫电化学感测是目前最为普遍发展的方式,其中的非均相的酶免疫分析方法包括竞争式分析与三明治式分析两种。竞争式的主要步骤包括:(1) 将对待测抗原具有特异性的抗体固定在电极表面,(2) 同时置入经酶标定的抗原和待测抗原,(3) 以润洗步骤移去未结合的抗原,置入此标定酶的基质 (substrate) 进行催化反应,并产生具有

电化学活性的产物，(4) 通过检测此产物进而定量待测抗原，基于此感测原理，在竞争式分析中所得电流信号和待测抗原浓度呈反比关系。相反，三明治式的感测机制所得电流信号与待测抗原浓度呈正比关系。免疫电化学传感器与传统免疫分析法相比，能够有效降低少量多样的分析操作成本。但免疫电化学传感器在实际应用时，经常因检测标的物浓度过低，造成后续电流的信号/噪音比过低的问题。因此，在发展免疫电化学测量系统时，需要发展一种具有放大氧化还原电流信号的生物感测电极试片，其具有经强化的电信号因而提升检测准确度的方法。

[0005] 此外，一般免疫分析方法可检测生物或生物分子种类的范围很广，例如常引起食物中毒事件的大肠杆菌与肠炎弧菌常为新颖的免疫分析方法的研究对象。食物中所含有的病原菌很多，传统上需要以不同的增菌性和选择性培养基进行分离，然后再进一步以生化反应测试才能将菌种准确地鉴定出来。这也是现今传统检测方法往往需要较多的时间和人力的缘故，而且经常在遇到新型或变种的病原菌时束手无策，这也是迫切需要解决的问题。

[0006] 第 6, 491, 803 号美国专利与第 1462880A 号和第 1462881A 号中国大陆专利申请公开案是纳米尺寸材质在生化感测电极中的相关应用。然而，所述专利仍不脱离现有技术，其仍需要繁复的制备过程。第 6, 491, 803 B1 号美国专利揭示一种试片，但所述试片制备时需先行混合所有反应物质（包含纳米金属粒子），随后通过网印来涂布于电极上，然而其网印条件要相当严格才能维持网印的均一性。第 1462880A 号和第 1462881A 号中国大陆专利申请公开案需依序涂布并干燥羧甲基纤维素等水溶性高分子载体、修改过的纳米碳管和酶反应层（包含酶、电子介质、稳定剂、缓冲液等）等至少三层物质的加工，电极试片制作过程极为繁复。中国台湾地区第 I276799 号发明专利是纳米碳管在生化感测电极中的一种简化加工的应用。

[0007] 但即便综合前述技术，包括电子介质的使用、亲和性生物分子辨识程序、纳米材质在电化学测量中的使用，并不能轻易推知、或可直接实施于免疫辨识过程中反复的浸泡、清洗程序，也不能同时解决低含量免疫检测标的物所伴随而来的低信噪比问题；因此，对此业界来说，仍存在不需如现有技术般繁琐的加工步骤且同时仍能保留足够大的电流信号的电极试片的需求。本发明就是为解决这种极具应用性的课题。

## 发明内容

[0008] 本发明的一目的在于提供一种用于测量电化学信号的电极试片，其表面经修改以增加氧化还原电子信号，其包含：

[0009] 平板绝缘基材；

[0010] 具有导电膜的电极系统，其中所述导电膜涂覆在所述平板绝缘基材的一面，以形成分离且不相连接的工作电极与参考电极；

[0011] 涂布在所述平板绝缘基材上的电绝缘层，其部分覆盖所述电极系统，使所述电极系统未被所述电绝缘层覆盖的部分分别形成包含工作电极和参考电极的接线端和电化学反应端；

[0012] 具有纳米尺寸的金粒子层，其至少部分覆盖所述工作电极的电化学反应端；以及

[0013] 脂溶性电子介质层，其至少部分覆盖所述工作电极的电化学反应端。

[0014] 本发明的另一目的在于提供一种生物传感器，其包含本发明的电极试片。

## 附图说明

[0015] 图 1(A) 是本发明一实施例的电极试片的制备及其元件展开示意图,图 1(B) 是电化学反应端 (5) 和其中的电极系统被纳米尺寸金粒子层 (7) 和脂溶性电子介质层 (9) 所覆盖的三种状态。

[0016] 图 2 是本发明一实施例的电极修改层示意图,图 2A 是表示所述电化学反应端的截面图,图 2B 是经脂溶性电子介质层 (9) 覆盖的电化学反应端,图 2C 是经脂溶性电子介质层 (9) 和纳米尺寸金粒子层 (7) 覆盖的电化学反应端,图 2D 是表面经架桥剂结合的电化学反应端,图 2E 是经脂溶性电子介质层 (9) 覆盖且表面具有架桥剂的电化学反应端,图 2F 是经脂溶性电子介质层 (9) 与纳米尺寸金粒子层 (7) 覆盖且表面具有架桥剂的电化学反应端,以及图 2G 是经纳米尺寸金粒子层 (7) 覆盖且表面具有架桥剂的电化学反应端。

[0017] 图 3 是本发明实例 1 的循环伏安法测定结果。

[0018] 图 4 是本发明实例 2 的循环伏安法测定结果。

[0019] 图 5(a) 到 (e) 是本发明实施例 3 的氧化还原酶固定流程图。

[0020] 图 6 是本发明实例 3 的安培 - 免疫测定结果。

## 具体实施方式

[0021] 本发明涉及一种电极试片和包含所述电极试片的生物传感器,其特征在于测量所述氧化还原酶 (13) 所转移出的电子信号时,所述纳米尺寸金粒子层 (7) 与脂溶性电子介质层 (9) 会协同放大所述电化学测量系统的电子信号。不同于以往现有技术的繁琐加工步骤,本发明电极试片的电化学反应区仅需两层物质的加工程序,因此可降低制作成本,且同时放大电流信号。

[0022] 本发明的一目的在于提供一种用于测量电化学信号的电极试片,其表面经修改以增加氧化还原电子信号,其包含:

[0023] 平板绝缘基材 (1);

[0024] 具有导电膜的电极系统 (2),其中所述导电膜涂覆在所述平板绝缘基材 (1) 的一面,以形成分离且不相连接的工作电极 (2a) 与参考电极 (2b);

[0025] 涂布在所述平板绝缘基材上的电绝缘层 (3),其部分覆盖所述电极系统 (2),使所述电极系统 (2) 未被所述电绝缘层覆盖的部分分别形成包含工作电极 (2a) 和参考电极 (2b) 的接线端 (4) 和电化学反应端 (5);

[0026] 具有纳米尺寸的金粒子层 (7),其至少部分覆盖所述工作电极 (2a) 的电化学反应端 (5);以及

[0027] 脂溶性电子介质层 (9),其至少部分覆盖所述工作电极 (2a) 的电化学反应端 (5)。

[0028] 根据本发明,所述平板绝缘基材 (1) 具有平直表面和电绝缘的特性,以及可耐受 40 到 200°C 的耐热能力以便于加温处理。适合作为本发明的平板绝缘基材的材料包括(但不限于)聚氯乙烯、玻璃纤维、聚酯、酚醛树脂板、聚对苯二甲酸乙二酯、聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯、聚酰胺、聚苯乙烯、玻璃或陶瓷。

[0029] 根据本发明,所述导电膜的电极系统优选是以网板印刷金属膜(即网板电极,如第 6, 923, 894 B2 号美国专利所揭示)或粘附金属膜(如第 6, 254, 736 B1 号美国专利所揭

示)的方式,涂覆在所述平板绝缘基材(1)的一面。适合的金属膜材料包括(但不限于)金、银、铂或钯,而适合网板印刷的印刷墨包括(但不限于)碳墨、金墨、银墨、碳墨与银墨的混合物、挥发性石墨、铜墨或以上的组合,如先印银墨再印碳墨。在根据本发明的一具体实施方面,其中所述网板电极包括一银墨层和一碳墨层,且所述碳墨层覆盖于所述银墨层上。

[0030] 根据本发明,所述电极系统中的工作电极的面积一般大于参考电极的面积。

[0031] 根据本发明,所述至少一个电绝缘层(3)厚度为约0.01到0.6mm。本领域常规的电绝缘材料均适用于本发明的电绝缘层,所述电绝缘材料以网印方法涂布于所述电极系统(2)上。在本发明的一具体实施方面,所述电极系统(2)上具有两个电绝缘层(3),其分别横跨所述电极系统(2)的中间位置和末端,以将所述电极系统(2)分隔成为电化学反应端(5)和接线端(4)。

[0032] 根据本发明,所述纳米尺寸金粒子层(7)以纳米尺寸胶体金溶液涂布在所述工作电极(2a)的电化学反应端(5)上,通过物理性吸附而固定于所述电化学反应端(5)表面上;或可预先以架桥剂(8)修改所述电化学反应端(5)表面(如图2F和G),以使纳米尺寸金粒子更均匀地固定于所述电化学反应端(5)表面上,且所述架桥剂(8)可后续链合其它物质(例如:蛋白质(如抗体、配体或受体)、化合物或核苷酸序列)。适用于本发明的纳米尺寸金粒子的尺寸为小于100纳米,其优选为约5到50纳米,更优选为约13纳米。根据本发明,适用于本发明的纳米尺寸胶体金溶液是氯化金( $\text{HAuCl}_4$ )经适当的催化剂,如柠檬酸钠溶液(sodium citrate),还原之后所得的纳米金悬浮液。

[0033] 根据本发明,所述脂溶性电子介质层(9)通过将脂溶性电子介质以有机溶剂溶解后的悬浮液涂布于所述电化学反应端(5)表面,使所述脂溶性电子介质以物理性附着方式吸附固定于所述电化学反应端(5)表面上。因此,所述脂溶性电子介质不会因为反复的浸泡、清洗程序而失效;同时也免去了以共价键结合固定于电极系统上的繁琐程序。适用于本发明的脂溶性电子介质具有接收或供给电子的氧化还原特性,其包括(但不限于)四硫富瓦烯(tetrathiafulvalene)、四氰代二甲基苯醌(tetracyanoquinodimethane)、麦尔多拉蓝(meldola blue)或二茂铁(ferrocene)或其衍生物;其中优选为二茂铁或其衍生物(Joseph wang, 2000. Analytical electrochemistry);更优选为1,1'-二茂铁二羧酸(ferrocenedicarboxylic acid)。适用于溶解所述脂溶性电子介质的有机溶剂包括(但不限于)酮类、醇类或二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO);其中优选为乙醇。

[0034] 根据本发明,所述纳米尺寸金粒子层与所述脂溶性电子介质层的涂覆顺序并无先后限制,优选为先涂覆所述纳米尺寸金粒子层后,再涂覆所述脂溶性电子介质层。

[0035] 根据本发明,所谓“至少部分覆盖”是指电化学反应端(5)全被纳米尺寸金粒子层(7)和脂溶性电子介质层(9)所覆盖(如图1的6a所示),或仅工作电极(2a)中的电化学反应端(5)完全被覆盖(如图1的6b所示)或部分被覆盖(如图1的6c所示)。

[0036] 根据本发明的用于测量电化学信号的表面经修改的电极试片,其中还可包括固定于工作电极(2)的电化学反应端(5)表面并可与标的物特异性结合的结合元件。适用于本发明的结合元件包括(但不限于)蛋白质(如抗体、抗原、蛋白质配体或受体)、核苷酸序列或化合物。技术人员可依据标的物的结合特性(如抗体/抗原或配体/受体结合,或者核苷酸杂交),选择适合的结合元件,并依据常规技术(Electra Gizeli等, 2001. Biomolecular Sensors)将所选用的结合元件固定于电化学反应端(5)表面,例如以架桥剂(8)将结合元

件固定于电化学反应端表面。如本发明所属技术领域中的一般技术人员众所周知,适用于本发明的标的物可为医学诊断标记、药物、细菌、毒素、环境污染物或核苷酸。

[0037] 本发明的电极试片在标的物与结合元件特异性结合后,可通过氧化还原酶(13)与其基质(substrate)反应产生电化学活性产物,再检测所述电化学活性产物以达到定量分析受测物的目的。适用于本发明的氧化还原酶(13)包括(但不限于)葡萄糖氧化酶、葡萄糖还原酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶或过氧化氢酶,其中优选为过氧化氢酶,而其可与过氧化氢反应进行电化学测量。根据本发明,利用过氧化氢酶、过氧化氢与脂溶性电子介质的组合的操作电压是约150到420mV。在根据本发明以安培-免疫传感器的电化学测量模式检测微生物抗原的方面,其运用的电压优选为约300mV。

[0038] 根据本发明的一优选实施方面(如图5所示),所述结合元件为第一抗体(10),所述第一抗体以亲和性与电化学反应端(5)表面结合,或通过架桥剂(8)的共价键与电化学反应端(5)表面结合(如图5(a)所示)。所述第一抗体经与受测抗原(11)专一性地结合(如图5(c)所示)后,而所述受测抗原(11)再与对所述抗原(11)具有专一性的第二抗体(12)-氧化还原酶(13)复合体结合(如图5(e)所示)形成一氧化还原酶层,再与过氧化氢反应进行电化学测量。

[0039] 根据本发明的另一优选实施方面,所述结合元件为抗原(11),所述抗原(11)以亲和性与电化学反应端(5)表面结合,或通过架桥剂(8)的共价键与电化学反应端(5)表面结合。所述抗原(11)经与受测第一抗体(10)专一性地结合后,而所述第一抗体(10)再与可与其结合的第二抗体(12)-氧化还原酶(13)复合体结合形成一氧化还原酶层,再与过氧化氢反应进行电化学测量。

[0040] 根据本发明,其中的第一抗体(10)与第二抗体(12)可为单株抗体或多株抗体。且本发明不仅可用于三明治式免疫辨识结合分析(例如图5所示),还可用于其它分析,例如竞争式辨识结合分析。

[0041] 根据本发明,技术人员可依据结合元件的种类(例如蛋白质(如抗体、抗原、蛋白质配体或受体)、核苷酸序列或化合物)选择适当的架桥剂(8)。架桥剂可以均匀且分散地形成单层或多层的排列聚合结构,根据本发明,架桥剂是具有双官能基的化合物,其一官能基用于与电化学反应端(5)的表面结合,另一官能基用于与结合元件结合。适用于本发明的架桥剂是官能基,包括(但不限于)羧酸基(carboxylic acid)、硫醇基(thiol)、醇基(alcohol)、胺基(amine)或醛基(aldehyde)的化合物;其中优选为含醛基化合物(Electra Gizeli等,2001.Biomolecular Sensors);而更优选为戊二醛(glutaraldehyde)。

[0042] 根据本发明的优选实施方面,所述氧化还原酶层的形成步骤包括:

[0043] (a) 结合第一抗体(10)或架桥剂(8)-第一抗体(10)复合体在电化学反应端(5)表面上,

[0044] (b) 洗去未结合的第一抗体(10)或架桥剂(8)-第一抗体(10)复合体,

[0045] (c) 结合抗原(11),

[0046] (d) 结合第二抗体(12)-氧化还原酶(13)复合体,和

[0047] (e) 洗去未固结合的第二抗体(12)-氧化还原酶(13)复合体;

[0048] 或另外可为:

[0049] (a) 结合第一抗体(10)或架桥剂(8)-第一抗体(10)复合体在电化学反应端(5)



表面上，

[0050] (b) 结合抗原 (11) 与第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体，形成抗原 (11)-第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体，

[0051] (c) 结合所述第一抗体 (10) 与所述抗原 (11)-第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体，或结合所述架桥剂 (8)-第一抗体 (10) 复合体与所述抗原 (11)-第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体，和

[0052] (d) 一起洗去未固结合的所述抗原 (11)-第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体；

[0053] 或还可为：

[0054] (a) 结合抗原 (11) 或架桥剂 (8)-抗原 (11) 复合体在电化学反应端 (5) 表面上，

[0055] (b) 洗去未结合的抗原 (11) 或架桥剂 (8)-抗原 (11) 复合体，

[0056] (c) 结合第一抗体 (10)，

[0057] (d) 结合第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体，和

[0058] (e) 洗去未固结合的第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体；

[0059] 又或者可为：

[0060] (a) 结合抗原 (11) 或架桥剂 (8)-抗原 (11) 复合体于电极表面在电化学反应端 (5) 表面上，

[0061] (b) 结合第一抗体与第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体，形成第一抗体 (10)-第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体，

[0062] (c) 结合所述抗原与所述第一抗体 (10)-第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体，或结合所述架桥剂 (8)-抗原 (11) 复合体与所述第一抗体 (10)-第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体，和

[0063] (d) 一起洗去未固结合的所述第一抗体 (10)-第二抗体 (12)-氧化还原酶 (13) 复合体。

[0064] 本发明的另一目的是提供一种生物传感器，其包含本文所述的电极试片和检测装置。优选的是，所述检测装置是由一电压输出装置，一信号接收装置，以及一显示装置所组成的电流传感器。所述电压输出装置能输出 300mV 以下的电压到根据本发明的电极试片的电化学反应区，促使反应层与检体中特定标的物反应后而使充满于电化学反应区的电子介质由还原状态氧化成为氧化状态。所述信号接收装置能将此状态改变时的电流、电压或电阻值接收，并传回显示装置，借此显示检体中特定标的物的含量。

[0065] 本发明的电极试片并不需要如现有技术般繁琐的加工步骤，同时能放大电流信号。此外，本发明的电极试片具有可降低检体需求量的设计，且可具有多个取样位置（例如：将电极试片靠近检体或将检体滴在电极试片上）。因此，本发明的电极试片不仅制备较为简便，可更方便而有效地从待分析物取样，以使患者的不便可减到最低，且同时仍能满足保留足够大的电子信号的需求。

[0066] 以下实施例将对本发明作进一步的说明，而不用以限制本发明的范围，所属领域的一般技术人员可轻易达成的修改和改变均涵盖于本发明的保护范围内。

[0067] [ 实施例 ]

[0068] 实例 1.

[0069] 根据第 6, 923, 894B2 号美国专利的实施例一中所示的方法, 将含有聚氯乙烯与聚氨酯的聚合树脂导电碳浆, 以网版印在一 PVC 板基材 (1) 的扁平表面上, 以形成由各自分离的一工作电极 (2a) 与一参考电极 (2b) 所组成的电极系统 (2), 然后烘干; 随即在印有所述电极系统 (2) 的同一侧, 涂布一电绝缘层, 且保留部分裸露的工作电极 (2a) 与参考电极 (2b) 以形成接线端 (4) 和电化学反应端 (5), 然后烘干, 完成一作为对照组 A 的电极试片 (如图 2 的 A)。

[0070] 取部分对照组 A 的电极试片, 并在适量的脂溶性电子介质 (1, 1' - 二茂铁二羧酸 (ferrocenedicarboxylic acid)) 中加入少量 95% 乙醇溶液, 并以超音波震荡器震荡使其完全溶解, 再滴加在所述对照组 A 的电极试片上修改所述电化学反应端 (5), 用水去除未结合的脂溶性电子介质 (9) 后, 完成具有脂溶性电子介质层 (9) 的实验组 B 电极试片 (如图 2 的 B)。另取部分对照组 A 的电极试片, 并将氯化金溶液 ( $\text{HAuCl}_4$ , Sigma G-4022) 以油浴方式加热, 再加入柠檬酸钠连续搅拌, 以形成呈现酒红色溶液, 以备妥含有直径约为 13 纳米的纳米胶体金颗粒溶液, 滴加在所述电化学反应端 (5), 以形成一纳米尺寸金粒子层 (7), 然后用水洗去未结合的金粒子层与盐类, 再进行前述脂溶性电子介质层 (9) 的涂覆程序, 而完成具有纳米尺寸金粒子层 (7) 与脂溶性电子介质层 (9) 复合修改的电极试片, 作为实验组 C (如图 2 的 C)。前述纳米胶体金颗粒溶液其在 520nm 的优选吸光值约为 0.9 到 1.2。

[0071] 这三种电极试片, 在过氧化氢存在的情况下, 在 pH 7.2 磷酸缓冲溶液中进行循环伏安 (cyclic voltammetry) 分析, 实验组 C 的电流峰值约为实验组 B 的 4 倍 (如图 3), 证实所述纳米尺寸金粒子层, 具有放大经脂溶性电子介质修改的电极的氧化还原电流的特性。

[0072] 实例 2.

[0073] 取部分实例 1 对照组 A 的电极试片, 将作为架桥剂 (8) 的戊二醛 (glutaraldehyde) 滴加于电化学反应端 (5), 再用水洗去未结合的架桥剂 (8), 完成一作为实验组 D 的电极试片 (如图 2 的 D)。取部分实验组 D 的电极试片, 并如实例 1 所示的方法备妥以酒精溶解的脂溶性电子介质 (1, 1' - 二茂铁二羧酸), 滴加于所述实验组 D 的电极试片上, 修改所述电化学反应端 (5), 用水去除未结合的脂溶性电子介质后, 完成具有脂溶性电子介质层 (9) 的实验组 E 电极试片 (如图 2 的 E)。另取部分实验组 D 的电极试片, 并以实例 1 所示的方法备妥含有直径约在 13 纳米的纳米胶体金颗粒溶液, 滴加于所述电化学反应端, 以形成一纳米尺寸金粒子层 (7), 然后水洗去未结合的金粒子与盐类, 再进行前述脂溶性电子介质层 (9) 的涂覆程序, 而完成具有纳米尺寸金粒子层 (7) 与脂溶性电子介质层 (9) 复合修改的电极试片, 作为实验组 F (如图 2 的 F)。进一步依据实例 1 的纳米胶体金颗粒溶液条件与循环伏安法, 测定 D、E 和 F 组的电极试片, 实验组 F 的电流峰值约为实验组 E 的 3 倍 (如图 4), 证实所述纳米尺寸金粒子层 (7), 具有放大经脂溶性电子介质修改的电极的氧化还原电流的特性。

[0074] 实例 3.

[0075] 为将本发明的技术应用于抗原 (11) 的实体检验, 先同前述实例 2 中实验组 F 的材料与流程, 制成经纳米尺寸金粒子层 (7) 与脂溶性电子介质层 (9) 复合修改的电极试片。备以抗 E. coli 0157:H7 的单株抗体作为第一抗体 (10), 另将作为第二抗体 (12) 的抗 E. coli 0157:H7 多株抗体与过氧化氢酶接合, 形成抗 E. coli 0157:H7 多株抗体 - 过氧化氢酶复合物。经由以下程序进行过氧化氢酶在电极上的固定 (如图 5):

[0076] (a) 结合架桥剂 (8)- 第一抗体 (10) 复合体在电极表面上,

[0077] (b) 洗去未结合的架桥剂 (8)- 第一抗体 (10) 复合体,

[0078] (c) 结合抗原 (11),

[0079] (d) 结合第二抗体 (12)- 过氧化氢酶复合体,

[0080] (e) 洗去未结合的第二抗体 (12)- 过氧化氢酶复合体。

[0081] 以在 pH 7.2 的磷酸缓冲水溶液中的过氧化氢当作过氧化氢酶基质, 采用固定电压 300mV 的安培 - 免疫感测电化学测量模式检测微生物抗原。同时, 另制备仅具有纳米尺寸金粒子层 (7) 的实验组 G 电极试片 (如图 2G), 以及实例 2 的实验组 D 的电极试片, 经过相同的酶固定化程序, 作为免疫感测微生物运用的比较。证实所述脂溶性电子介质层 (9), 具有再放大经纳米尺寸金粒子修改的电极的氧化还原电流的特性 (如图 6)。

[0082] 因此, 本发明所揭示的具有纳米尺寸金粒子层 (7) 与脂溶性电子介质层 (9) 复合修改的电极试片, 可协同放大氧化还原电流信号。同时, 此复合修改电极试片即便经历多次的浸泡与清洗, 固定于所述复合修改电极表面上的脂溶性电子介质也不会因为反复的浸泡、清洗程序而失效, 同时也不需要以共价键结合固定于电极上, 因此具有减少工序、降低成本的优点。对于希望兼顾电极试片的制造成本、质量与应用的相关电化学仪器制造厂商来说, 本发明所揭示的具有经纳米尺寸金粒子层 (7) 与脂溶性电子介质层 (9) 复合修改的电极试片, 确实可提供有效的解决方案。

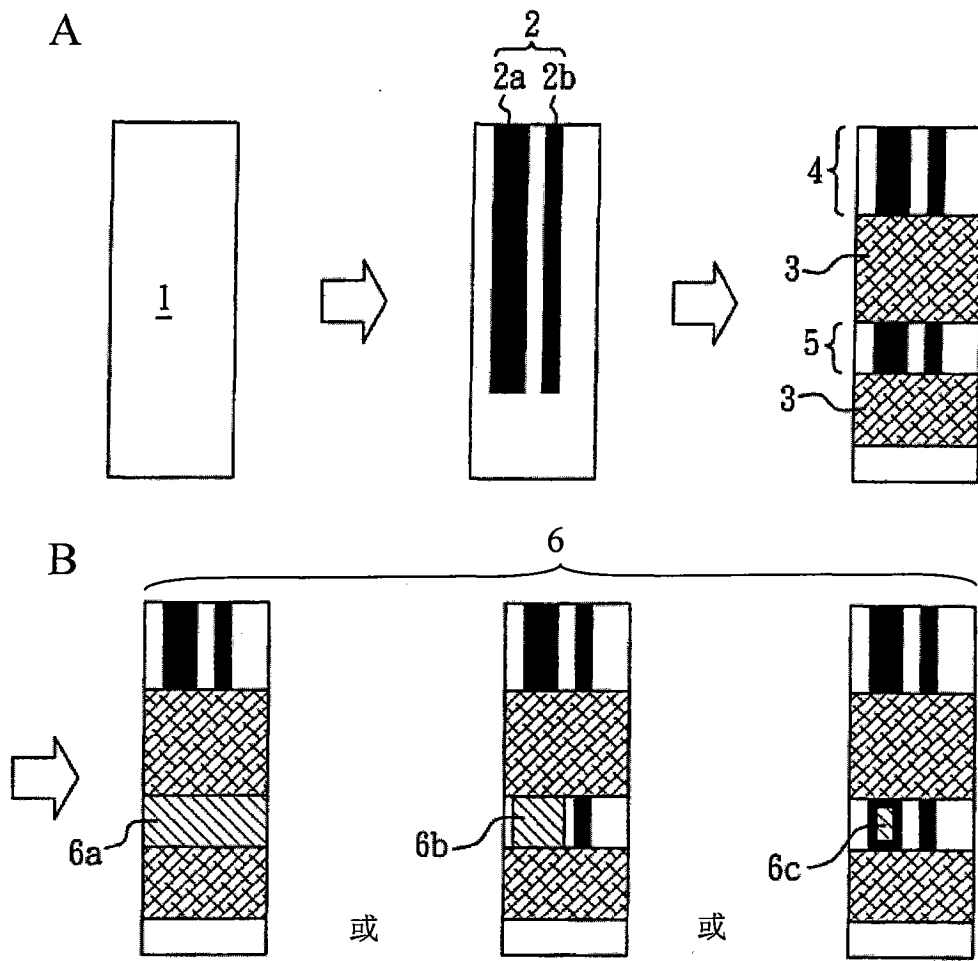


图 1

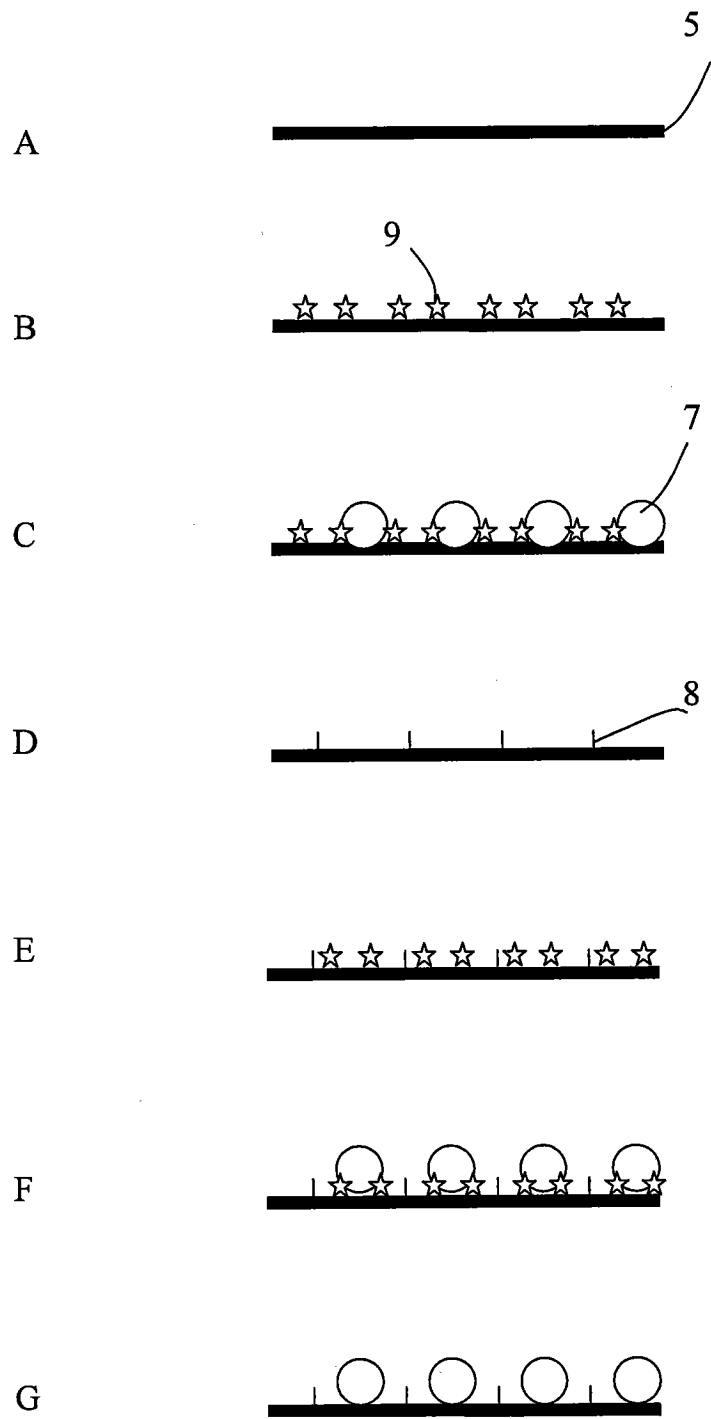


图 2

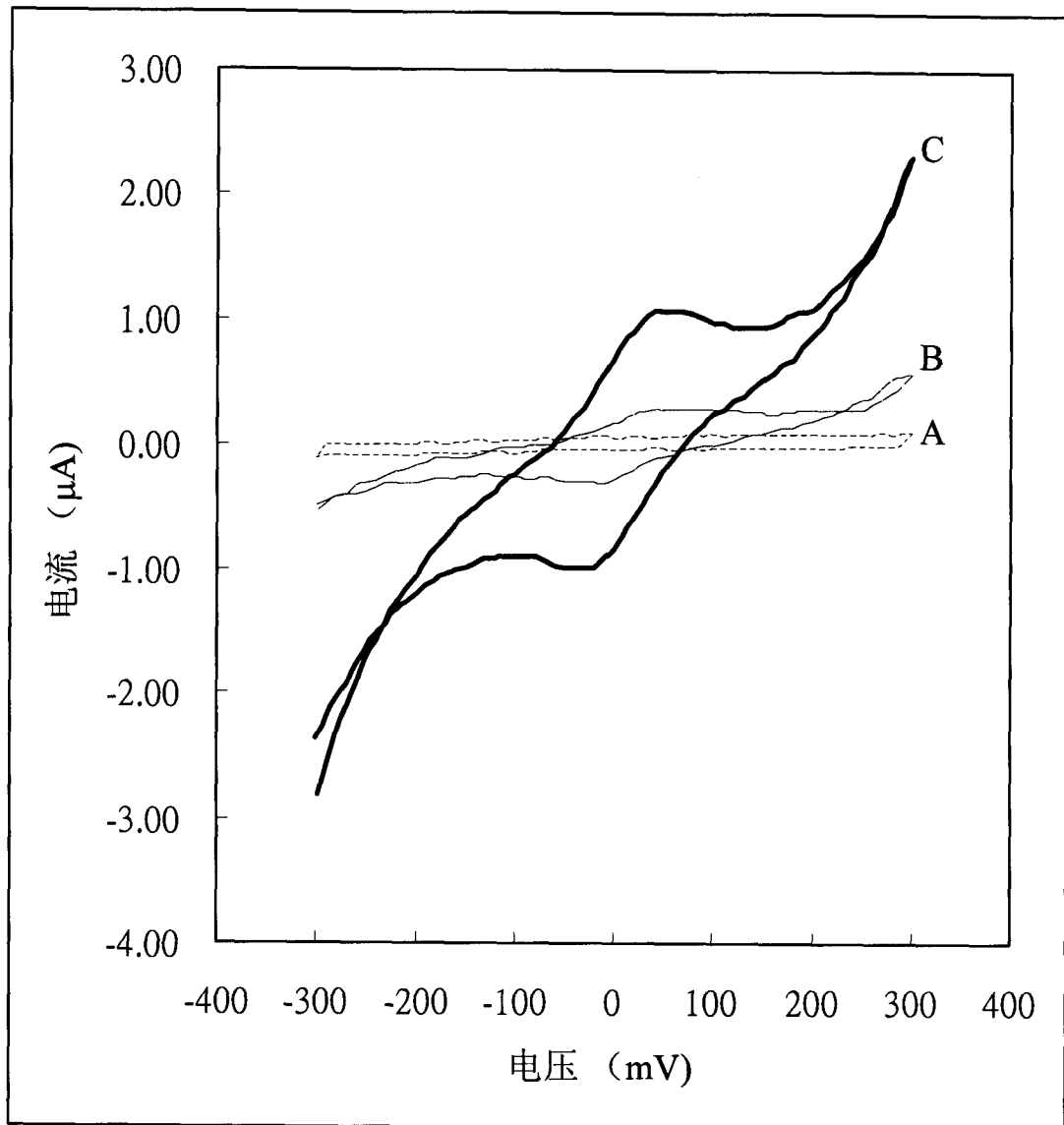


图 3

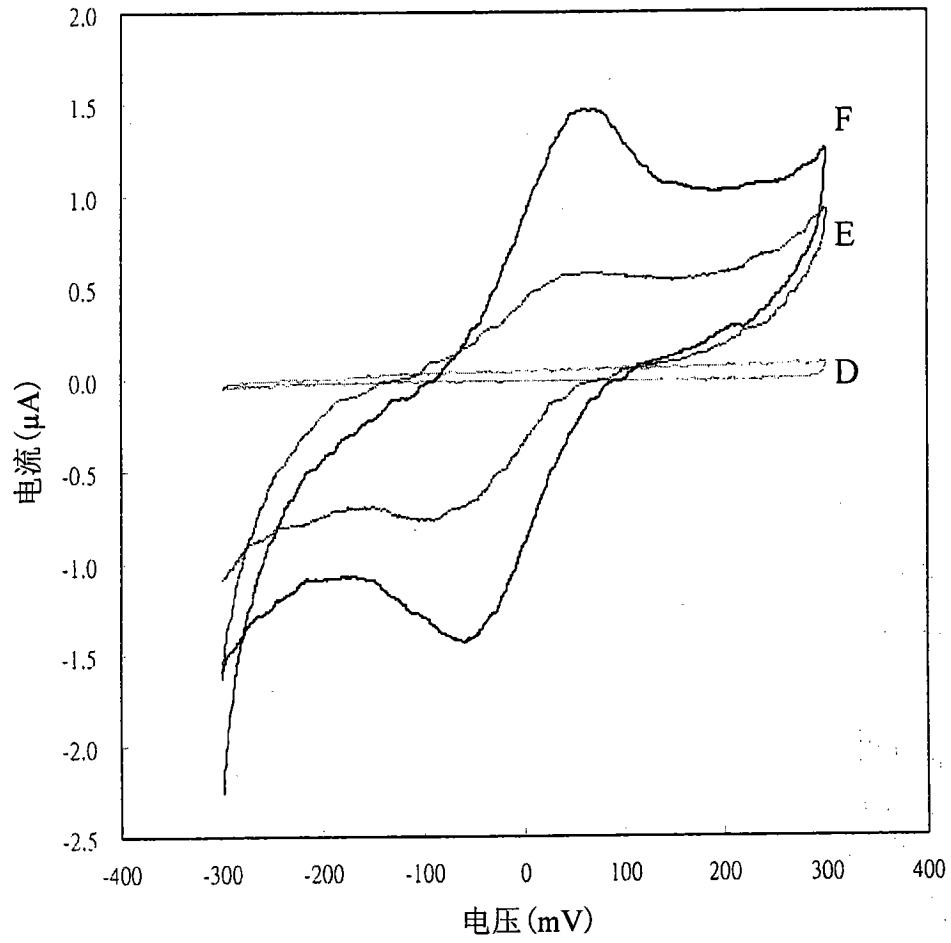


图 4

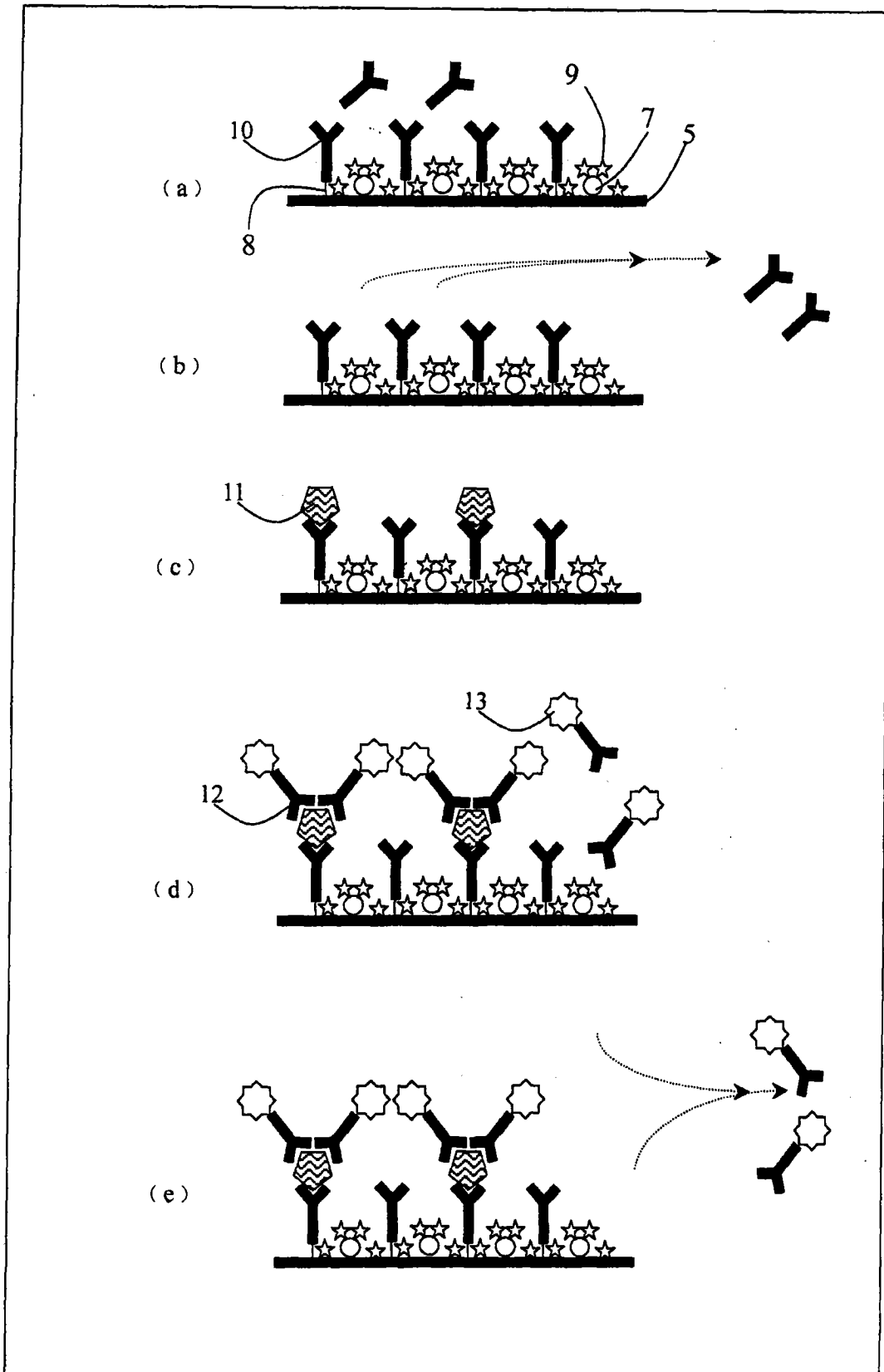


图 5



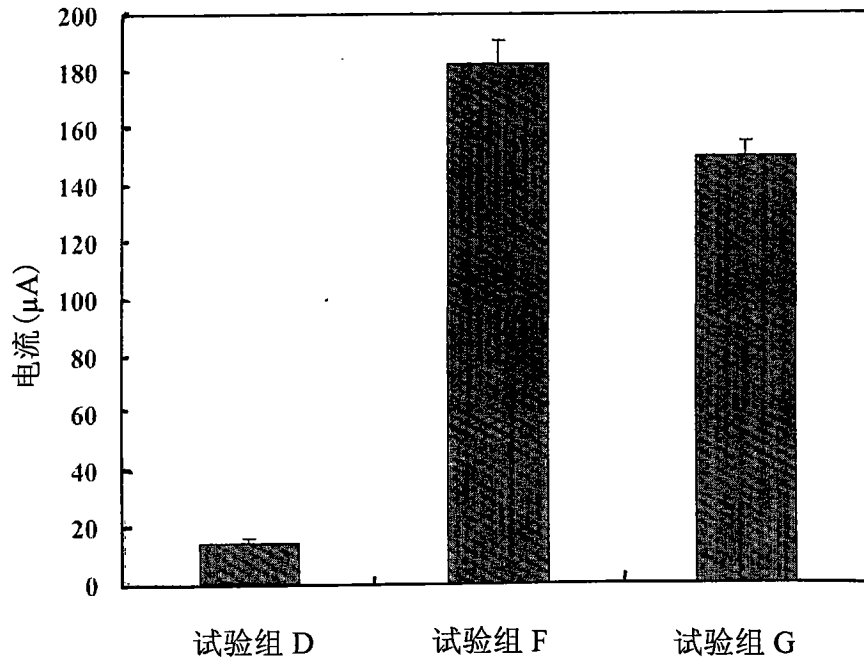


图 6