(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101427128 B
(45)授权公告日 2013.12.04

(21)申请号 200780013998.7
(22)申请日 2007.04.19
(30)优先权数据
116176/2006 2006.04.19 JP
(85)PCT申请进入国家阶段日
2008.10.20
(86)PCT申请的申请数据
PCT/JP2007/058527 2007.04.19
(87)PCT申请的公布数据
WO2007/123179 JA 2007.11.01
(73)专利权人 松下电器产业株式会社
地址 日本大阪府
(72)发明人 中山润子 高原佳史 山西永吏子 伊藤佳洋
(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 11038
代理人 陈昕
(51)Int.Cl.
G01N 27/327(2006.01)
G01N 27/416(2006.01)
(56)对比文件
CN 1725006 A,2006.01.25,
WO 2005054840 A1,2005.06.16,
CN 1725006 A,2006.01.25,
审查员 李明瑞

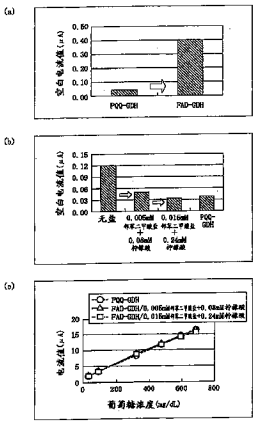
权利要求书1页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

生物传感器

(57)摘要

本发明涉及一种生物传感器，在该测定液体样品中的葡萄糖的生物传感器中，在设置在绝缘性基板上的、含有以黄素腺嘌呤二核苷酸为辅酶的葡糖脱氢酶的试剂层中，添加分子内至少含有一个羧基的有机酸或有机酸盐、分子内至少含有一个氨基或羰基的有机酸或有机酸盐、糖醇、或可溶性蛋白质中的任一种，或它们的组合的添加剂。由此可以提高对葡萄糖的底物特异性和保存稳定性，而且可以避免对葡萄糖以外的糖类的作用。



CN 101427128 B

1. 一种生物传感器，它是具有在绝缘基板上形成的至少由工作电极和对电极构成的电极、和包含与样品液中特定成分进行特异反应的试剂的试剂层的生物传感器，其特征在于，上述试剂层含有电子传递介体、以黄素腺嘌呤二核苷酸为辅酶的葡糖脱氢酶、以及分子内至少含有一个羧基的有机酸或其盐，上述有机酸是邻苯二甲酸或邻苯二甲酸盐以及柠檬酸或柠檬酸盐的组合。

2. 权利要求 1 所述的生物传感器，其特征在于，上述试剂层在上述电极上形成。

3. 权利要求 1 所述的生物传感器，其特征在于，上述试剂层按照电极被配置在该试剂层的试剂溶解于样品液后扩散的扩散区域内的方式形成。

4. 权利要求 1 所述的生物传感器，其特征在于，上述试剂层还含有氨基酸、或它们的取代物或衍生物、或其盐。

5. 权利要求 4 所述的生物传感器，其特征在于，上述氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、肌氨酸、甜菜碱和牛磺酸。

6. 权利要求 5 所述的生物传感器，其特征在于，上述氨基酸是牛磺酸。

7. 权利要求 1 所述的生物传感器，其特征在于，上述试剂层还含有糖醇。

8. 权利要求 7 所述的生物传感器，其特征在于，上述糖醇是链状的多元醇、或环状糖醇，或它们的取代物或衍生物。

9. 权利要求 8 所述的生物传感器，其特征在于，上述糖醇是麦芽糖醇、乳糖醇中的任一者或两者。

10. 权利要求 1 所述的生物传感器，其特征在于，上述试剂层还含有可溶性蛋白质。

11. 权利要求 10 所述的生物传感器，其特征在于，上述可溶性蛋白质是牛血清白蛋白、卵清白蛋白、明胶、或胶原。

生物传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及对样品中特定成分进行分析的生物传感器，特别是涉及构成生物传感器的试剂层的试剂构成。

背景技术

[0002] 生物传感器是利用微生物、酶、抗体等生物材料的分子识别能力，应用生物材料作为分子识别元件的传感器。即，是利用固定化的生物材料识别目标特定成分时发生的反应、由于微生物的呼吸导致酶的消耗、酶反应、发光等的传感器。

[0003] 在生物传感器中，酶传感器的实用化也取得了进展，特别是葡萄糖测定用的酶传感器正被用于糖尿病的病状监视。作为葡萄糖用的酶传感器的一个例子例如已公布的专利文献 1 提出的那样的生物传感器。

[0004] 该生物传感器是在绝缘性基板上形成由测定电极、对电极和检测电极构成的电极层，在该电极层上形成含有能与样品液中特定成分进行特异反应的酶等的试剂层的传感器。作为上述试剂层中含有的酶，使用以吡咯并喹啉醌为辅酶的葡糖脱氢酶（以下称为 PQQ-GDH）。另外，试剂层中除了酶 PQQ-GDH 以外，还可含有铁氰化钾等电子受体。

[0005] 当将血液添加到上述那样构成的生物传感器时，在试剂层中酶 PQQ-GDH 与血液中的葡萄糖反应，生成葡糖酸内酯和电子，由生成的该电子将作为电子受体的铁氰化离子还原为亚铁氰化离子。然后加一定的电压，使亚铁氰化离子再度氧化为铁氰化离子。由此时产生的电流值可以求出血液中的葡萄糖浓度（血糖值）。

[0006] 专利文献 1 :特开 2000-171428 号公报

[0007] 专利文献 2 :特开 2001-343350 号公报

[0008] 专利文献 3 :特开 2002-207022 号公报

发明内容

[0009] 发明要解决的问题

[0010] 然而，上述以往的生物传感器中使用的酶 PQQ-GDH 不仅与葡萄糖反应，也与麦芽糖等底物以外的糖类反应。因此，如果正进行含有艾考糊精、麦芽糖等的输液的患者使用该生物传感器测定血糖值，当然显示出比实际的血糖值高的值。如果以这样的测定值为基础给予过量的胰岛素，恐怕要出医疗事故。

[0011] 本发明正是为了解决上述问题而完成的发明，目的在于提供对葡萄糖底物特异性专一的、可以回避对葡萄糖以外的糖类的作用的可进行高精度测定的生物传感器。

[0012] 解决问题的手段

[0013] 为了解决上述课题，本发明的第 1 方面的生物传感器，是带有与样品液中特定成分进行特异反应的试剂的试剂层，对样品液中特定成分的浓度进行计测的生物传感器，其特征在于，上述试剂层含有以黄素腺嘌呤二核苷酸为辅酶的葡糖脱氢酶以及分子内至少含有一个羧基的有机酸或其盐。

[0014] 本发明的第 2 方面的生物传感器，其特征在于，在第 1 方面所述的生物传感器中，使用在绝缘性基板上形成的至少由工作电极和对电极构成的电极计测上述样品液中特定成分的浓度。

[0015] 本发明的第 3 方面的生物传感器，其特征在于，在第 2 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，且上述试剂层在上述电极上形成。

[0016] 本发明的第 4 方面的生物传感器，其特征在于，在第 2 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，且上述试剂层按照电极被配置在该试剂层的试剂溶解于样品液后扩散的扩散区域内的方式形成。

[0017] 本发明的第 5 方面的生物传感器，其特征在于，在第 1 方面所述的生物传感器中，上述有机酸是脂肪族羧酸、碳环羧酸、杂环羧酸或它们的取代物、或衍生物。

[0018] 本发明的第 6 方面的生物传感器，其特征在于，在第 5 方面所述的生物传感器中，上述有机酸是柠檬酸、柠檬酸盐，或邻苯二甲酸、邻苯二甲酸盐中的任一种，或它们的组合。

[0019] 本发明的第 7 方面的生物传感器，是带有与样品液中特定成分进行特异反应的试剂的试剂层，对样品液中特定成分的浓度进行计测的生物传感器，其特征在于，上述试剂层含有以黄素腺嘌呤二核苷酸为辅酶的葡糖脱氢酶、以及分子内至少含有一个氨基或羰基的有机酸或其盐。

[0020] 本发明的第 8 方面的生物传感器，其特征在于，在第 7 方面所述的生物传感器中，使用在绝缘性基板上形成的至少由工作电极和对电极构成的电极计测上述样品液中特定成分的浓度。

[0021] 本发明的第 9 方面的生物传感器，其特征在于，在第 8 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，且上述试剂层在上述电极上形成。

[0022] 本发明的第 10 方面的生物传感器，其特征在于，在第 8 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，且上述试剂层按照电极被配置在该试剂层的试剂溶解于样品液后扩散的扩散区域内的方式形成。

[0023] 本发明的第 11 方面的生物传感器，其特征在于，在第 7 方面所述的生物传感器中，上述有机酸是氨基酸、或它们的取代物或衍生物。

[0024] 本发明的第 12 方面的生物传感器，其特征在于，在第 11 方面所述的生物传感器中，上述有机酸是牛磺酸。

[0025] 本发明的第 13 方面的生物传感器，是具有包含与样品液中的特定成分进行特异反应的试剂的试剂层，对样品液中特定成分的浓度进行计测的生物传感器，其特征在于，上述试剂层含有以黄素腺嘌呤二核苷酸为辅酶的葡糖脱氢酶和糖醇。

[0026] 本发明的第 14 方面的生物传感器，其特征在于，在第 13 方面所述的生物传感器中，使用在绝缘性基板上形成的至少由工作电极和对电极构成的电极计测上述样品液中特定成分的浓度。

[0027] 本发明的第 15 方面的生物传感器，其特征在于，在第 14 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，且上述试剂层在上述电极上形成。

[0028] 本发明的第 16 方面的生物传感器，其特征在于，在第 14 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，按照电极被配置在该试剂层的试剂溶解于样品液后扩散的扩散区域内的方式形成。

[0029] 本发明的第 17 方面的生物传感器，其特征在于，在第 13 方面所述的生物传感器中，上述糖醇是链状的多元醇、或环状糖醇，或它们的取代物或衍生物。

[0030] 本发明的第 18 方面的生物传感器，其特征在于，在第 17 方面所述的生物传感器中，上述糖醇是麦芽糖醇、乳糖醇中任一者，或两者。

[0031] 本发明的第 19 方面的生物传感器，是具有包含与样品液中特定成分进行特异反应的试剂的试剂层，对样品液中特定成分的浓度进行计测的生物传感器，其特征在于，上述试剂层含有以黄素腺嘌呤二核苷酸为辅酶的葡糖脱氢酶和可溶性蛋白质。

[0032] 本发明的第 20 方面的生物传感器，其特征在于，在第 19 方面所述的生物传感器中，使用在绝缘性基板上形成的至少由工作电极和对电极构成的电极计测上述样品液中特定成分的浓度。

[0033] 本发明的第 21 方面的生物传感器，其特征在于，在第 20 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，且上述试剂层在上述电极上形成。

[0034] 本发明的第 22 方面的生物传感器，其特征在于，在第 20 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，且上述试剂层按照电极被配置在该试剂层的试剂溶解于样品液后扩散的扩散区域内的方式形成。

[0035] 本发明的第 23 方面的生物传感器，其特征在于，在第 19 方面所述的生物传感器中，上述可溶性蛋白质是牛血清白蛋白、卵清白蛋白、明胶、或胶原。

[0036] 本发明的第 24 方面的生物传感器，是具有包含与样品液中特定成分进行特异反应的试剂的试剂层，对样品液中特定成分的浓度进行计测的生物传感器，其特征在于，上述试剂层含有以黄素腺嘌呤二核苷酸为辅酶的葡糖脱氢酶，以及选自分子内至少含有一个羧基的有机酸或其盐、分子内至少含有一个氨基或羰基的有机酸或其盐、糖醇、和可溶性蛋白质中的至少 2 种以上添加剂。

[0037] 本发明的第 25 方面的生物传感器，其特征在于，在第 24 方面所述的生物传感器中，使用在绝缘性基板上形成的至少由工作电极和对电极构成的电极计测上述样品液中特定成分的浓度。

[0038] 本发明的第 26 方面的生物传感器，其特征在于，在第 25 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，且上述试剂层在上述电极上形成。

[0039] 本发明的第 27 方面的生物传感器，其特征在于，在第 25 方面所述的生物传感器中，上述试剂层含有电子传递介体，且上述试剂层按照电极被配置在该试剂层的试剂溶解于样品液后扩散的扩散区域内的方式形成。

[0040] 发明效果

[0041] 利用本发明的生物传感器，由于在含有 FAD-GDH 的试剂层中已添加了至少含有羧基的有机酸、或有机酸盐，所以可在不妨碍酶反应等的情况下抑制空白 (blank) 电流值，另外，由于可以同时抑制与血液中存在的各种各样杂质的不必要反应，所以可实现直线性良好，而且各个传感器的偏差小，对葡萄糖的底物特异性高的可进行高精度测定的生物传感器。

[0042] 另外，利用本发明的生物传感器，由于在含有 FAD-GDH 的试剂层中已添加了至少含有氨基或羰基的有机酸、或有机酸盐，所以可以形成致密而且均质的试剂层，可以飞跃提高传感器对葡萄糖浓度的应答性，可以实现对葡萄糖的底物特异性高的可进行高精度测定

的生物传感器。

[0043] 另外，利用本发明的生物传感器，由于在含有 FAD-GDH 的试剂层中已添加了糖醇，所以可在不妨碍酶反应等的情况下抑制空白电流值，所以可实现直线性良好，而且各个传感器的偏差小，对葡萄糖的底物特异性高以及保存稳定性优良的可进行高精度测定的生物传感器。

[0044] 另外，利用本发明的生物传感器，由于在含有 FAD-GDH 的试剂层中已添加了可溶性蛋白质，所以可在不妨碍酶反应等的情况下缓和血细胞比容的影响和环境温度的影响，也可以同时抑制与血液中存在的各种各样杂质的不必要反应，实现保存稳定性以及对葡萄糖的底物特异性高的可进行高精度测定的生物传感器。

附图说明

[0045] 图 1 是表示本发明的生物传感器的构成例的图。

[0046] 图 2 是表示本发明的生物传感器的另一构成例的图。

[0047] 图 3 是表示作为样品液添加麦芽糖时的传感器应答特性的图。

[0048] 图 4 是表示作为样品液添加葡萄糖时的传感器应答特性的图。

[0049] 图 5(a) 是表示作为样品液使用精制水时的空白值的图，图 5(b) 是表示作为试剂使用有机酸，作为样品液添加精制水时的空白值的图，图 5(c) 是表示作为样品液添加葡萄糖（浓度）时的传感器应答特性的图。

[0050] 图 6 是表示在作为样品液使用全血时的传感器中，作为氨基酸的一个例子添加牛磺酸导致的电流值的应答特性的图。

[0051] 图 7(a) 是表示作为样品液使用全血，在试剂层添加了糖醇时于高温高湿环境下的保存特性的图，图 7(b) 是表示本底电流的应答特性的图，图 7(c) 是表示电流的应答特性的图。

[0052] 图 8(a) 是表示作为样品液使用全血时血细胞比容对传感器应答特性的影响的图，图 8(b) 是表示在试剂层中添加 BSA 时的血细胞比容对传感器应答特性的影响的图。

[0053] 符号说明

[0054] 1 基板

[0055] 2 工作电极

[0056] 3 对电极

[0057] 4 检测电极

[0058] 5 试剂层

[0059] 6 隔板

[0060] 6a 切口部

[0061] 7 空腔

[0062] 8 盖板

[0063] 9 气孔

[0064] 10、11、12 引线部

[0065] 101 基板

[0066] 102 工作电极

[0067] 103 对电极

[0068] 105 试剂层

[0069] 106 隔板

[0070] 106a 切口部

[0071] 107 空腔

[0072] 108 盖板

[0073] 109 气孔

[0074] 110、111 引线部

具体实施方式

[0075] 以下参照附图就本发明的实施方式进行说明。

[0076] (实施方式 1)

[0077] 以下就本发明的实施方式 1 的生物传感器进行说明。

[0078] 图 1 是表示本实施方式 1 的 3 电极方式的生物传感器的构成例子的图。

[0079] 图 1 所示 3 电极方式的生物传感器是具备在其表面形成导电层的绝缘性基板 1、试剂层 5、带有切口部 6a 的隔板 6 和带有气孔 9 的盖板 8 的传感器。

[0080] 作为上述绝缘性基板 1 的材料，如有：聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯、聚酰亚胺等。

[0081] 作为上述导电层的材料，如有：金、铂、钯等贵金属或碳等单体材料，或者，碳糊或贵金属糊等复合材料。

[0082] 作为上述隔板 6 和盖板 8 的材料，如有：聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯、聚酰亚胺、聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚酰胺、聚氯乙烯、聚偏氯乙烯、尼龙等。

[0083] 就这样构成的生物传感器的制作方法进行说明。

[0084] 在绝缘性基板 1 上，通过溅镀法或丝网印刷法等形成导电层后，使用激光等设置狭缝，形成工作电极 2、对电极 3 和检测电极 4。所谓检测电极 4 不仅发挥着用于检测检品量不足的电极的作用，而且也可以用作参比电极或对电极的一部分。

[0085] 接下来在电极 2、3、4 上，形成含有以黄素腺嘌呤二核苷酸为辅酶的葡糖脱氢酶(以下称为 FAD-GDH)、电子传递介体和添加剂的试剂层 5。然后在试剂层 5 和电极 2、3、4 上通过使隔板 6 与盖板 8 贴合，形成供给样品液的空腔 7。予以说明，向生物传感器供给样品液通过毛细管现象实现，通过在盖板 8 上设置用于使空腔 7 内的空气排到生物传感器外部的气孔 9 可以促进毛细管现象，实现样品液的顺畅供给。

[0086] 当将样品液由空腔 7 的入口通过毛细管现象供给到空腔 7 内，到达试剂层 5 的位置时，样品液中的特定成分与试剂层 5 所含的试剂反应。由该反应产生的电流的变化量可通过经由工作电极 2、对电极 3、检测电极 4 的各个引线部 10、11、12 连接的外部的测定仪器读取。对样品液中的特定成分进行定量。

[0087] 以下就试剂层 5 中含有的试剂构成进行说明。

[0088] 首先说明酶。

[0089] 在本实施方式 1 中作为试剂层 5 中含有的酶采用 FAD-GDH。以下用图 3 和图 4 就采用 FAD-GDH 的理由进行说明。

[0090] 图 3 表示在葡萄糖浓度 80mg/dL 的存在下，按照 0 ～ 200mg/dL 的浓度范围添加麦芽糖时的传感器应答特性。在图 3 中，纵轴表示 PQQ-GDH 和 FAD-GDH 对麦芽糖的作用性（即，表示与麦芽糖 0mg/dL 灵敏度的偏差度（％）），横轴表示添加的麦芽糖浓度 (mg/dL)。

[0091] PQQ-GDH 是以往的生物传感器中使用的酶，传感器应答值与麦芽糖的添加量成比例地上升。而 FAD-GDH 是在本实施方式 1 的生物传感器中采用的酶，即使增加麦芽糖的添加量，传感器的应答值也与没有添加麦芽糖时一样，显示出低的值，可见其对麦芽糖的作用性低。

[0092] 图 4 是表示作为样品液添加葡萄糖时的传感器应答特性。在图 4 中，纵轴表示传感器应答值（电流值（μA）），横轴表示葡萄糖浓度 (mg/dL)。

[0093] 作为酶使用 PQQ-GDH 时，传感器应答值与葡萄糖浓度成比例地上升。另外，作为酶使用 FAD-GDH 时，与使用 PQQ-GDH 同样，传感器应答值与葡萄糖浓度成比例地上升。因此两个酶对葡萄糖的作用性几乎相同。

[0094] 由上述可知，本实施方式 1 采用的酶 FAD-GDH 虽然与以往的生物传感器中采用的酶 PQQ-GDH 几乎相同地具有对葡萄糖的底物特异性，但对麦芽糖的作用性却很低。

[0095] 因此，在本实施方式 1 中，通过采用 FAD-GDH 作为酶，可以实现对葡萄糖的底物特异性高、对麦芽糖的作用性低，即，与葡萄糖的相关性高、且不受麦芽糖影响的优越的生物传感器。

[0096] 下面，就添加剂进行说明。

[0097] 在本实施方式 1 中，作为添加到试剂层 5 中的添加剂，使用分子内至少带有一个羧基的有机酸、或有机酸盐。

[0098] 该分子内至少带有一个羧基的有机酸或有机酸盐具有抑制氧化型的电子传递介体与存在于试剂中含有的酶蛋白的富有反应性的一部分官能团接触，而使电子传递介体由氧化型改性（被还原）为还原型的功能。

[0099] 因此，在试剂层 5 中通过添加分子内至少含有一个羧基的有机酸或有机酸盐，可以在热或水分存在下抑制由于试剂层 5 中含有的 FAD-GDH 与电子传递介体的还原反应而产生的噪声电流，从而防止生物传感器的性能变差，提高保存稳定性。而且由于可以同时抑制与血液中特别是血细胞中存在的各种各样杂质的不必要反应，所以可以控制各个传感器的偏差，实现良好的直线性，即，可以做到回归式的倾斜度变大，截距变小，从而可以进行高精度的测定。

[0100] 予以说明，作为分子内至少含有一个羧基的有机酸或有机酸盐，如有脂肪族羧酸、碳环羧酸、杂环羧酸等或它们的盐。

[0101] 例如，作为脂肪族羧酸，如有丙二酸、琥珀酸、戊二酸、己二酸、马来酸、富马酸等或它们的盐。对于效果的程度，直链越长、分子量越大的脂肪族羧酸或它们的盐的效果越大，特别优选烃链在 3 个以上的脂肪族羧酸或其盐。另外作为生物传感器中使用的试剂，由于要求对水的溶解性高，所以更优选分子结构中带有更多的亲水性官能团的脂肪族羧酸或其盐。

[0102] 作为碳环羧酸，如有苯甲酸、邻苯二甲酸、间苯二甲酸、对苯二甲酸等或它们的盐，使用这些化合物也可得到与上述同样的效果。

[0103] 作为杂环羧酸，如呋喃 -2- 羧酸、烟酸、异烟酸等或它们的盐，通过使用这些化合

物也可得到与上述同样的效果。

[0104] 除了上述的脂肪族羧酸和碳环羧酸、具有杂环的羧酸或羧酸盐以外，即使是羧酸和羧酸盐的一部分官能团被别的官能团取代的、例如苹果酸、草酰乙酸、柠檬酸、酮戊二酸等或它们的盐，也可获得与上述同样的效果。

[0105] 在这些有机酸或有机酸盐中，最适合的是戊二酸、己二酸、邻苯二甲酸、苯甲酸。

[0106] 予以说明，这些有机酸或有机酸盐的添加量，相对于酶溶液浓度 500 ～ 2500U/ml，作为试剂溶液浓度，优选为 0.0005 ～ 100mM 范围。

[0107] 使用实施方式 1 那样的生物传感器，由于在试剂层 5 中含有了对葡萄糖的底物特异性高的 FAD-GDH 和至少带有羧基的有机酸或有机酸盐，因此能够在不妨碍酶反应等情况下抑制空白电流值，而且能够同时抑制与存在于血液中的各种各样夹杂物质的不必要的反应，所以可以提高对葡萄糖的底物特异性和保存稳定性，可以进行高精度的测定。

[0108] （实施方式 2）

[0109] 以下对实施方式 2 的生物传感器进行说明。

[0110] 本实施方式 2 的生物传感器的特征在于，图 1 所示的试剂层 5 含有 FAD-GDH、电子传递介体、以及分子内至少带有一个氨基或羰基的有机酸或有机酸盐。予以说明，其它构成要素与上述实施方式 1 的生物传感器相同，所以省略了重复说明。

[0111] 以下就添加剂进行说明。

[0112] 在本实施方式 2 中，作为添加到试剂层 5 中的添加剂，使用分子内至少带有一个氨基或羰基的有机酸或有机酸盐。

[0113] 分子内至少带有一个氨基或羰基的有机酸或有机酸盐可以使得试剂层 5 形成极平滑、而且均质的表面状态。

[0114] 特别是当试剂层 5 中含有作为电子传递介体使用的铁氰化钾等无机盐时，虽然在试剂溶液的干燥过程中，试剂层易结晶，但由于在试剂层 5 中含有分子内至少带有一个氨基或羰基的有机酸或有机酸盐，所以能够阻止该无机盐结晶的成长。

[0115] 而且由于阻止结晶成长的无机盐以微小粒子状态存在于试剂层 5 中，所以可以与酶分子进行密切、均匀地接触，从而实现与酶分子的电子传递效率良好的试剂层状态。另外由于可提高试剂层的溶解性，所以有可能使得传感器的灵敏度和直线性飞跃提高。

[0116] 另外，作为分子内至少含有一个氨基或羰基的有机酸或有机酸盐，如有：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸等和它们的盐，或肌氨酸、甜菜碱、牛磺酸等氨基酸，或它们的取代物或衍生物和它们的盐。而在这些氨基酸或取代物、或衍生物和它们的盐中，甘氨酸、丝氨酸、脯氨酸、苏氨酸、赖氨酸、牛磺酸抑制结晶的效果更好而特别适用。

[0117] 予以说明，这些氨基酸或它们的取代物或衍生物和它们的盐的添加量，相对于酶溶液浓度 500 ～ 2500U/ml，作为试剂溶液浓度，优选为 10 ～ 100mM。

[0118] 使用实施方式 2 那样的生物传感器，由于在试剂层 5 中含有了对葡萄糖的底物特异性高的 FAD-GDH 和至少带有一个氨基或羰基的有机酸或有机酸盐，所以可以形成致密、且均质的试剂层，同时，也可以飞跃提高传感器对葡萄糖浓度的应答性，可以进行高精度的测定。

[0119] （实施方式 3）

[0120] 以下对实施方式 3 的生物传感器进行说明。

[0121] 本实施方式 3 的生物传感器的特征在于，图 1 所示的试剂层 5 含有 FAD-GDH、电子传递介体和糖醇。予以说明，其它构成要素与上述实施方式 1 的生物传感器相同，所以省略了重复说明。

[0122] 以下就添加剂进行说明。

[0123] 在本实施方式 3 中，作为添加到试剂层 5 的添加剂使用糖醇。

[0124] 糖醇具有抑制氧化型电子传递介体与存在于试剂中含有的酶蛋白的富有反应性的官能团接触而使电子传递介体由氧化型改性（被还原）为还原型的功能。

[0125] 因此，在试剂层 5 中通过添加糖醇，可以在热或水分存在下抑制由于试剂层 5 中含有的 FAD-GDH 与电子传递介体的还原反应而产生的噪声电流，从而防止生物传感器的性能变差。而且由于可以同时抑制与血液中特别是血细胞中存在的各种各样夹杂物质的不必要反应，所以直线性良好，而且可以控制各个传感器的偏差。

[0126] 另外，作为糖醇，如有山梨糖醇、麦芽糖醇、木糖醇、甘露醇、乳糖醇、还原帕拉金糖、阿拉伯糖醇、甘油、核糖醇、半乳糖醇、景天庚酮糖醇、甘露庚糖醇、庚七醇、苏合香醇、远志糖醇、艾杜糖醇、塔罗糖醇、阿洛糖醇、イシリトール、还原淀粉糖化物、イシリトール等链状的多元醇或环状糖醇。另外即使是这些糖醇的立体异构体、取代物、或衍生物也可获得同样的效果。予以说明，在这些糖醇中，由于麦芽糖醇、乳糖醇材料单价比较便宜、容易获得，而且抑制噪声电流的效果极高，因此可以说是最合适的材料。

[0127] 另外，这些糖醇的添加量，相对于酶溶液浓度 500 ～ 2500U/ml，作为试剂溶液浓度，优选为 0.1 ～ 50mM。

[0128] 使用实施方式 3 那样的生物传感器，由于在试剂层 5 中含有了对葡萄糖的底物特异性高的 FAD-GDH 和糖醇，所以可在不妨碍酶反应等前提下抑制空白电流值，而且能够同时抑制与存在于血液中的各种各样夹杂物质的不必要的反应，所以可以提高对葡萄糖的底物特异性和保存稳定性，可以进行高精度的测定。

[0129] （实施方式 4）

[0130] 以下对实施方式 4 的生物传感器进行说明。

[0131] 本实施方式 4 的生物传感器的特征在于，图 1 所示的试剂层 5 含有 FAD-GDH、电子传递介体和可溶性蛋白质。予以说明，其它构成要素与上述实施方式 1 的生物传感器同样，所以省略了重复说明。

[0132] 以下就添加剂进行说明。

[0133] 在本实施方式 4 中，作为添加到试剂层 5 的添加剂使用可溶性蛋白质。

[0134] 可溶性蛋白质具有在不抑制酶反应等的前提下、运输药物等的运输作用、维持渗透压、维持电解质平衡等多种功能。

[0135] 因此，通过在试剂层 5 中添加可溶性蛋白质，能够在不抑制酶反应等前提下对向葡萄糖电极附近的供给进行限制，降低血细胞比容的影响、以及环境温度的影响。

[0136] 另外，作为可溶性蛋白质，如有：牛血清白蛋白 (BSA)、卵清白蛋白、明胶、胶原等。

[0137] 另外，这些可溶性蛋白质的添加量，相对于酶溶液浓度 500 ～ 2500U/ml，优选为 0.01 ～ 1.00wt％。

[0138] 使用实施方式 4 那样的生物传感器，由于在试剂层 5 中含有了对葡萄糖的底物特

异性高的FAD-GDH和可溶性蛋白质，所以可在不妨碍酶反应等前提下缓和血细胞比容的影响、以及环境温度的影响，可以提高保存稳定性和对葡萄糖的底物特异性，进行高精度的测定。

[0139] 另外，在上述实施方式1至4中，作为添加到上述试剂层5的添加剂，分别以添加分子内至少带有一个羧基的有机酸或有机酸盐、分子内至少带有一个氨基或羰基的有机酸或有机酸盐、糖醇、可溶性蛋白质为例进行了说明，当然也可以将它们组合使用。

[0140] 而在上述实施方式1至4中，作为试剂中含有的电子传递介体，可以使用铁氰化钾、对苯醌及其衍生物、吩嗪硫酸甲酯、亚甲蓝、二茂铁及其衍生物等。

[0141] 另外，在上述实施方式1至4中，试剂层5作为被设置在电极上的层，进行了说明，具体来说，可以在电极上的整个表面、或一部分配置试剂层5，除此之外，也可以在不使生物传感器的性能变差的范围内，即，按照电极被设置在试剂层中的试剂溶解在样品液后扩散的扩散区域内的方式配置试剂层5。

[0142] 另外，在上述实施方式1至4中，示出了3个电极方式的生物传感器，但也可以制作2个电极方式的生物传感器。这样的2个电极方式的生物传感器的构成例如图2所示。

[0143] 图2所示的2个电极方式的生物传感器具有绝缘性基板101、试剂层105、隔板106和盖板108。各构成要素的材料可与图1同样。

[0144] 以下就这样的生物传感器的制作方法进行说明。

[0145] 在绝缘性基板101上通过溅镀法或丝网印刷法等形成导电层后，使用激光等设置狭缝，形成工作电极102和对电极103。在该电极上，形成含有FAD-GDH、电子传递介体和添加剂的试剂层105。然后在试剂层105和电极102、103上通过使含有切口部106a的隔板106与盖板108贴合，形成供给样品液的空腔107。

[0146] 而样品液由空腔107的入口通过毛细管现象供给到空腔107内，当到达试剂层5的位置时，样品液中的特定成分与试剂层105中含有的试剂反应。由该反应产生的电流的变化量可通过经由工作电极102、对电极103的各个引线部110、111连接的外部的测定仪器读取，对样品液中的特定成分进行定量。

[0147] （实施例1）

[0148] 在由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的绝缘基板101上通过丝网印刷设置由工作电极102和对电极103构成的电极层。在该电极层上形成含有酶(FAD-GDH：600～1500U/ml)、电子传递介体（铁氰化钾）、氨基酸（牛磺酸：50～85mM)和糖醇（麦芽糖醇：1～3mM)的试剂层105。然后在其上设置由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的隔板106和同样由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的盖板108。由此就制作出了2个电极方式的血糖值测定传感器。

[0149] 在上述制作的血糖值测定传感器中计测作为样品液使用精制水时的传感器应答值（空白电流值）。其结果如图5(a)所示。这里为了比较，作为酶使用PQQ-GDH，给出了向试剂层中，对于酶溶液浓度1000～1500U/ml，添加了0.05～0.15mM的柠檬酸盐、牛磺酸50～85mM、麦芽糖醇1～3mM的以往的生物传感器的传感器应答特性。

[0150] 就像由该图5(a)所了解的那样，以往的使用PQQ-GDH的生物传感器的空白电流值约为0.03μA，与此相比，本发明的使用FAD-GDH的生物传感器的空白电流值表现出高达0.40μA的值。由于如果空白电流值越高，就越不能进行葡萄糖的正确的定量，所以有必要抑制空白电流值。

[0151] 因此，将具有抑制噪声电流功能的有机酸添加到试剂层。具体来说，按照相对于FAD-GDH酶溶液浓度1500U/ml，将邻苯二甲酸盐的浓度调配成0.05mM、柠檬酸盐的浓度调配成0.08mM那样来添加，就像图5(b)所示的那样，与没添加时相比，空白电流值变小。另外当将邻苯二甲酸盐的浓度调配成0.015mM、柠檬酸盐的浓度调配成0.24mM那样添加时，空白电流值变得更小。

[0152] 此时对于葡萄糖浓度的传感器应答电流值如图5(c)所示。就像图5(c)所示的那样，可知对于FAD-GDH即使添加像上述那样调配的有机酸，也具有与PQQ-GDH几乎同等程度的对葡萄糖的底物特异性。

[0153] 像上述那样，通过在试剂层中添加有机酸，可以制作使空白电流值变小、对葡萄糖的底物特异性高的可进行高精度测定的生物传感器。

[0154] (实施例2)

[0155] 以下就试剂层105中添加氨基酸时的传感器应答特性进行说明。

[0156] 本实施例2的生物传感器通过与上述实施例1同样的步骤进行制作。然后在该生物传感器的试剂层105中再添加作为氨基酸的一例的牛磺酸。

[0157] 图6中给出了向试剂层105中添加0mM、15mM和85mM牛磺酸时的电流的应答特性。

[0158] 就像由图6所示的那样，可知牛磺酸的添加量越多，传感器应答特性越飞跃提高。

[0159] 因此，通过在试剂层105中添加牛磺酸，可以实现对葡萄糖的底物特异性高、可进行高精度测定的生物传感器。

[0160] (实施例3)

[0161] 以下就试剂层105中添加糖醇时的传感器应答特性进行说明。

[0162] 本实施例3的生物传感器通过与上述实施例1同样的步骤进行制作。然后在该生物传感器的试剂层105中再添加作为糖醇的一个例子的麦芽糖醇或乳糖醇。另外，作为样品液，使用含有葡萄糖的浓度为80mg/dL的全血。

[0163] 图7(a)中给出了向试剂层105中分别添加0mM、5mM和10mM麦芽糖醇或乳糖醇时的高温高湿环境下(温度40℃、湿度80％)的保存特性。

[0164] 就像由图7(a)所示的那样，添加麦芽糖醇或乳糖醇可以抑制高温高湿环境引起的电流值上升，传感器的保存特性明显提高。

[0165] 而图7(b)中给出了向试剂层105中分别添加0mM、5mM和10mM麦芽糖醇或乳糖醇时的高温高湿环境下(温度40℃、湿度80％)的本底电流的应答特性。

[0166] 就像由图7(b)所示的那样，通过添加麦芽糖醇或乳糖醇，由于可以抑制高温高湿环境下的本底电流值的上升，传感器的保存特性提高。

[0167] 图7(c)中给出了向试剂层105中分别添加0mM、5mM和10mM麦芽糖醇或乳糖醇时的电流的应答特性。

[0168] 就像由图7(c)所示的那样，即使添加麦芽糖醇或乳糖醇，也能在不使传感器对葡萄糖浓度的应答特性降低的情况下维持良好的直线性。

[0169] 以上所述表明，通过添加作为糖醇的麦芽糖醇或乳糖醇，可以实现直线性良好、保存稳定性高、可进行高精度测定的生物传感器。

[0170] (实施例4)

[0171] 以下就血细胞比容的影响进行说明。

[0172] 图8(a)是表示血细胞比容对作为样品液使用含有葡萄糖浓度350mg/dL的全血时的传感器应答特性的影响的图。在图8中，纵轴表示与血细胞比容值45％灵敏度的偏差，横轴表示血细胞比容值。

[0173] 当对使用PQQ-GDH时的传感器应答特性与使用FAD-GDH时的传感器应答特性进行比较时，如果血细胞比容值在约25～75％的范围，看不到由血细胞比容引起的传感器应答特性的差异。如果血细胞比容值在25％以下的低浓度范围，在血细胞比容的影响上，能看到显著差异，确认在使用FAD-GDH时的血细胞比容的影响较大。

[0174] 像上述可知，作为酶使用FAD-GDH时的传感器应答特性与使用PQQ-GDH时相比，特别是在低血细胞比容浓度范围，容易受到血细胞比容的影响。因此期待不易受血细胞比容影响的保存稳定性高的生物传感器。

[0175] 因此，在试剂层105中添加了可溶性蛋白质BSA。图8(b)是表示血细胞比容对试剂层中添加BSA时的传感器应答特性的影响的图。

[0176] 当在试剂层105中添加0.1wt％的BSA时，在低血细胞比容浓度范围，可以将血细胞比容的影响抑制至与采用PQQ-GDH时的同等程度。

[0177] 由此，可以制作将血细胞比容的影响抑制至与以往的使用PQQ-GDH的生物传感器同等的程度的，保存稳定性、且对葡萄糖的底物特异性高的生物传感器。

[0178] 产业实用性

[0179] 本发明的生物传感器可用作对葡萄糖的底物特异性高的可进行高精度测定的葡萄糖用酶传感器。

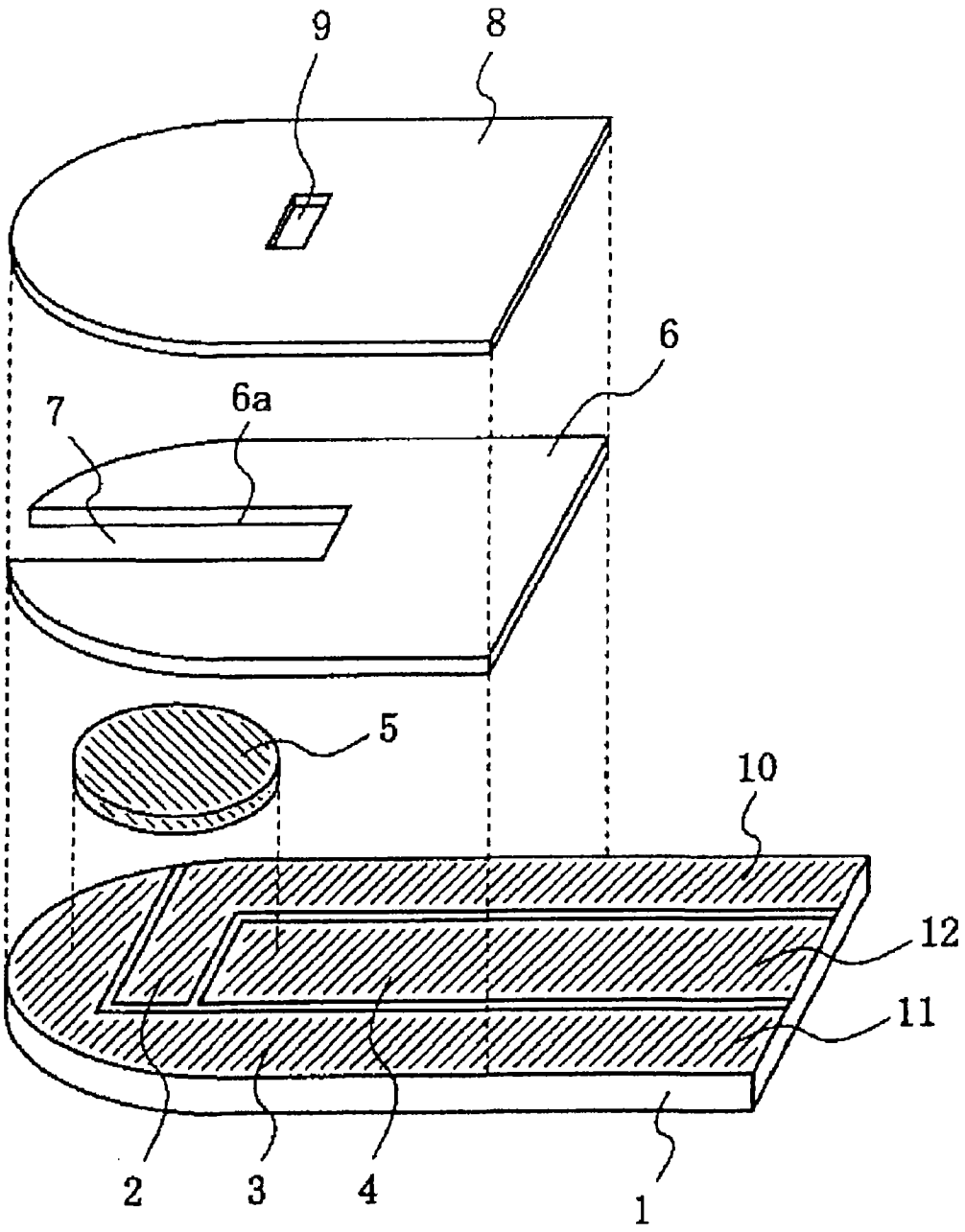


图 1

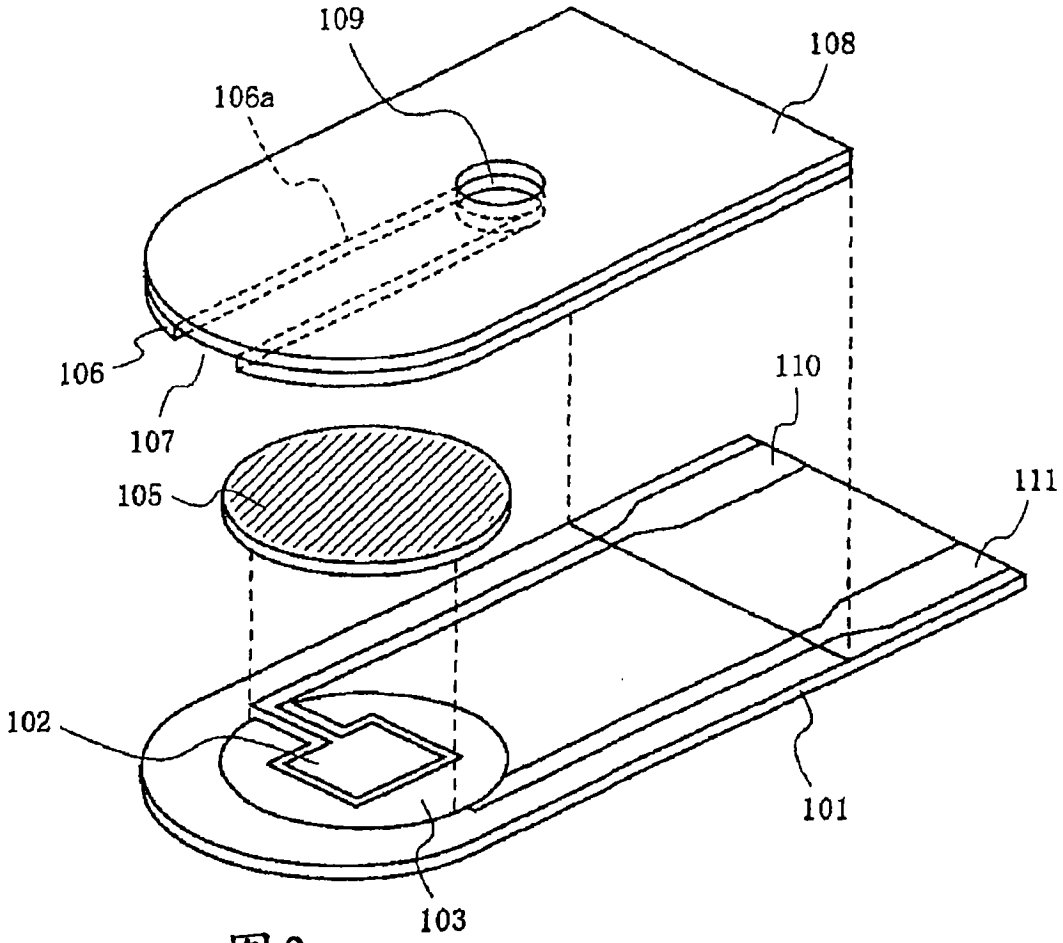


图 2

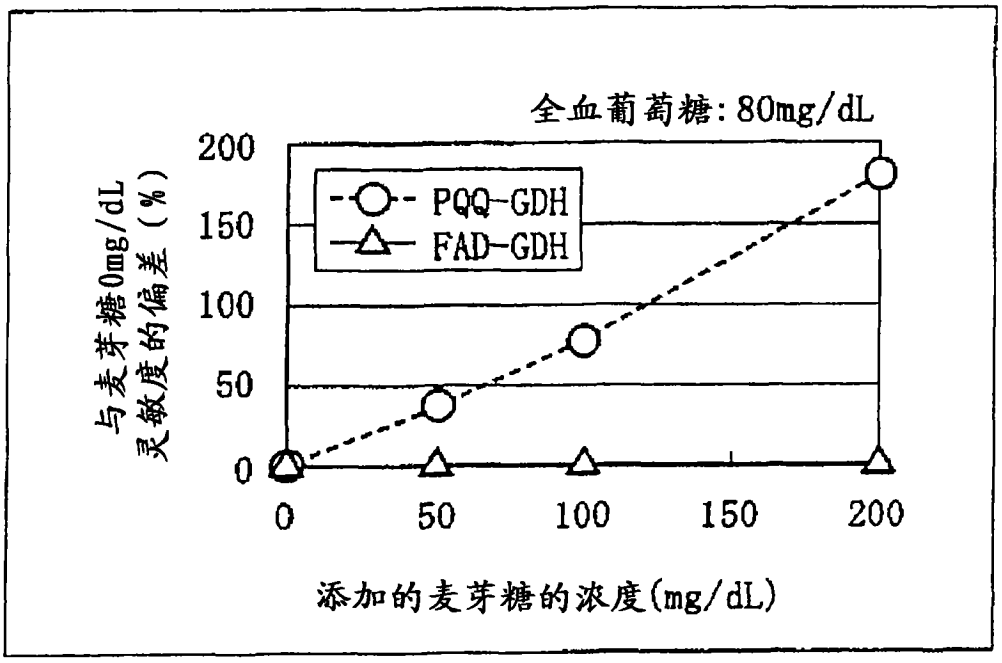

全血葡萄糖:80mg/dL
与麦芽糖0mg/dL灵敏度的偏差(%)
200
150
100
50
0
PQQ-GDH
FAD-GDH
0
50
100
150
200
添加的麦芽糖的浓度(mg/dL)

图 3

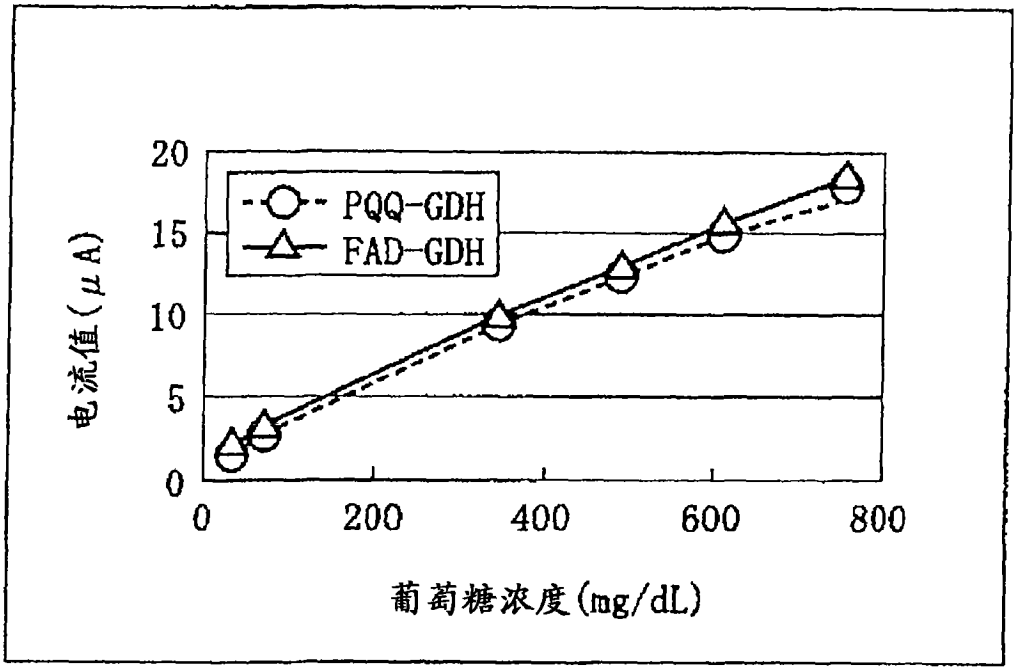
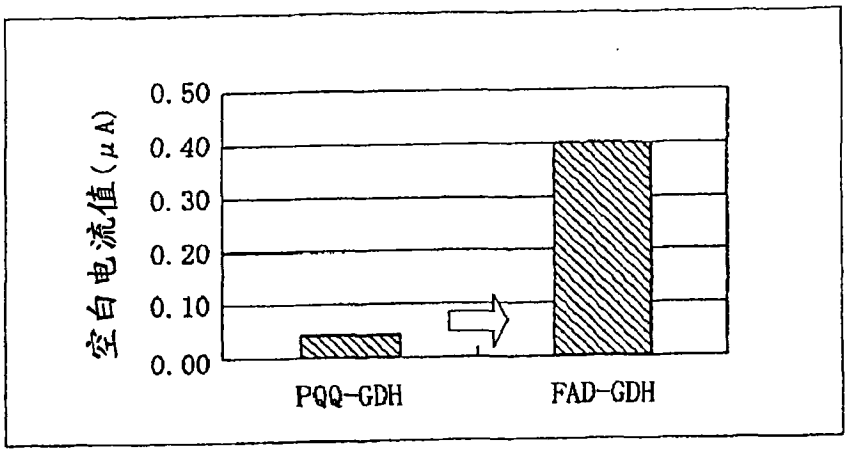
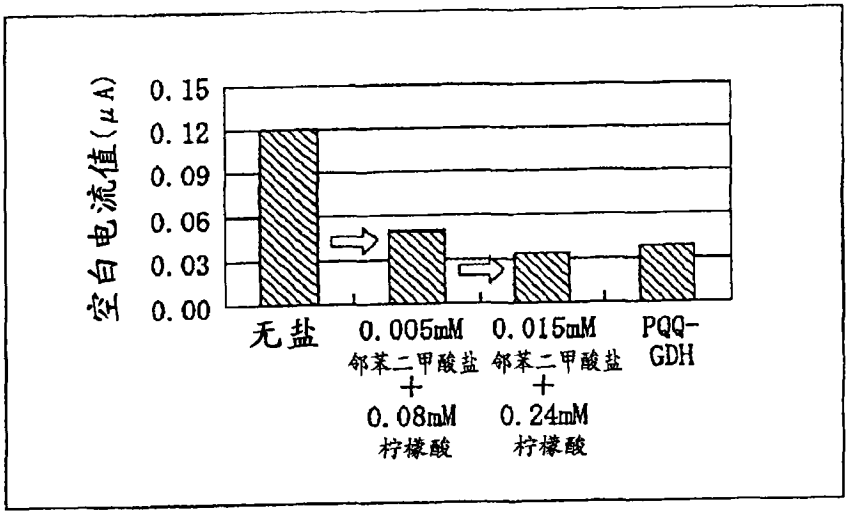

电流值(μA)
20
15
10
5
0
PQQ-GDH
FAD-GDH
0
200
400
600
800
葡萄糖浓度(mg/dL)

图 4

(a)


空白电流值(μA)
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
PQQ-GDH
FAD-GDH

(b)


空白电流值(μA)
0.15
0.12
0.09
0.06
0.03
0.00
无盐
0.005mM 邻苯二甲酸盐 + 0.08mM 柠檬酸
0.015mM 邻苯二甲酸盐 + 0.24mM 柠檬酸
PQQ-GDH

(c)

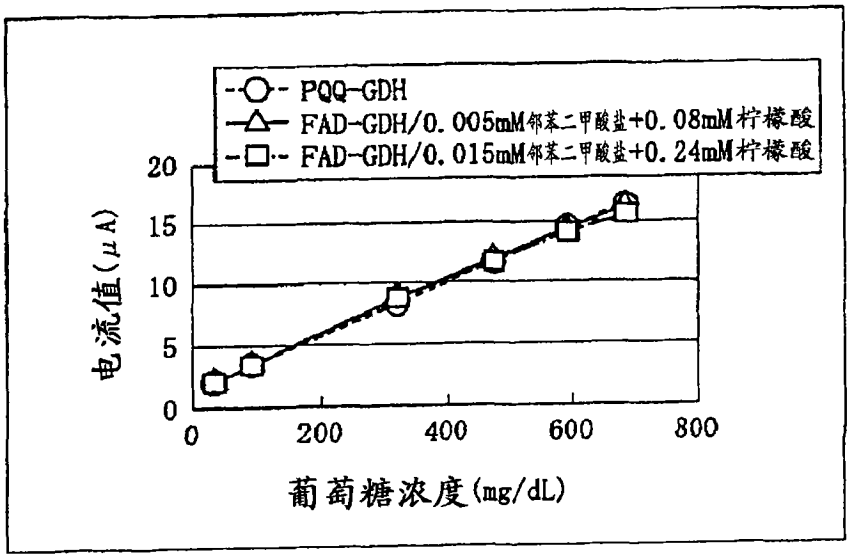

PQQ-GDH
FAD-GDH/0.005mM邻苯二甲酸盐+0.08mM柠檬酸
FAD-GDH/0.015mM邻苯二甲酸盐+0.24mM柠檬酸
电流值(μA)
20
15
10
5
0
0
200
400
600
800
葡萄糖浓度(mg/dL)

图 5

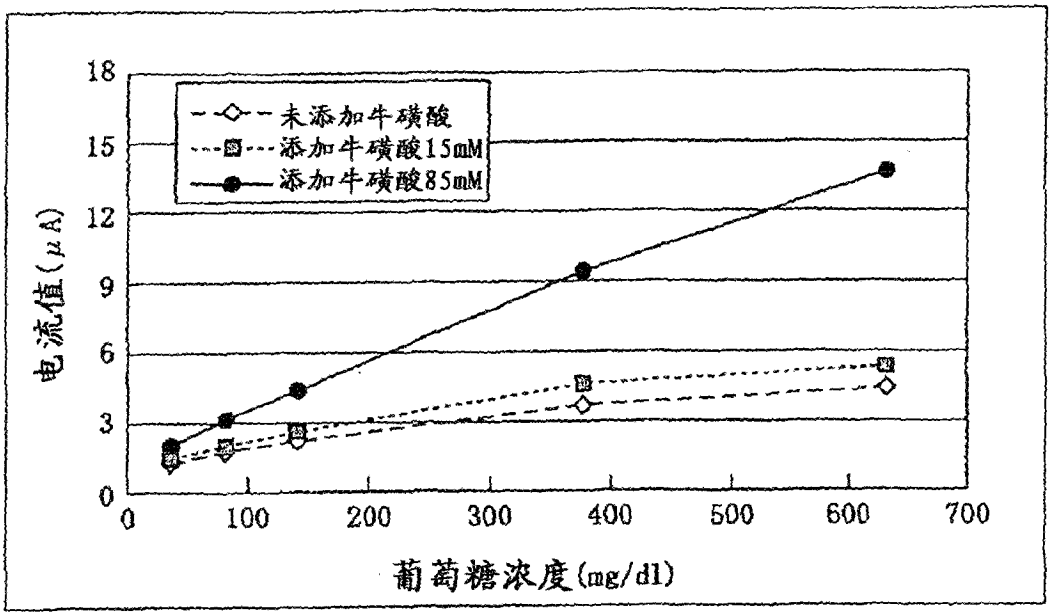
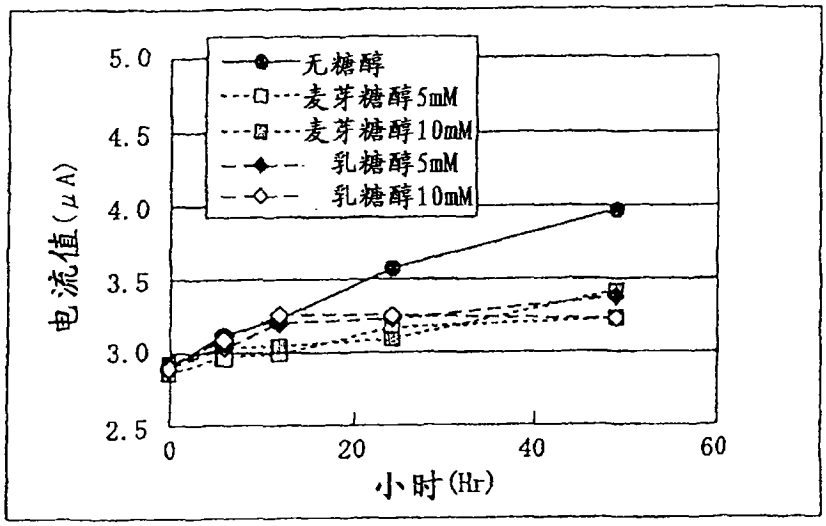
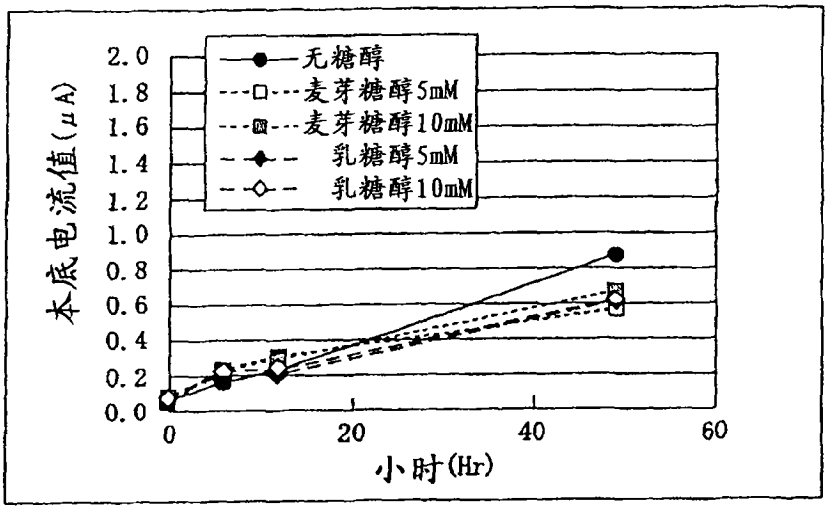

18
15
12
9
6
3
0
电流值(μA)
未添加牛磺酸
添加牛磺酸15mM
添加牛磺酸85mM
0
100
200
300
400
500
600
700
葡萄糖浓度(mg/dl)

图 6

(a)


5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
电流值(μA)
0
20
40
60
小时(Hr)
无糖醇
麦芽糖醇5mM
麦芽糖醇10mM
乳糖醇5mM
乳糖醇10mM

(b)


2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
本底电流值(μA)
0
20
40
60
小时(Hr)
无糖醇
麦芽糖醇5mM
麦芽糖醇10mM
乳糖醇5mM
乳糖醇10mM

(c)

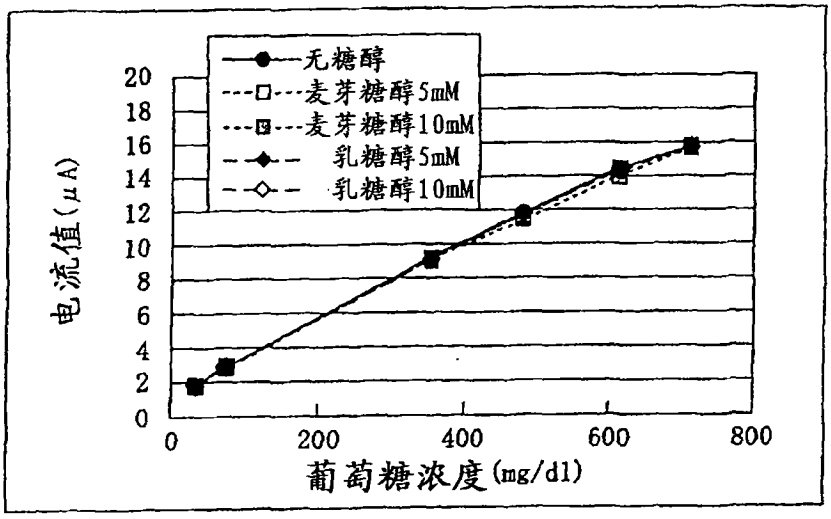
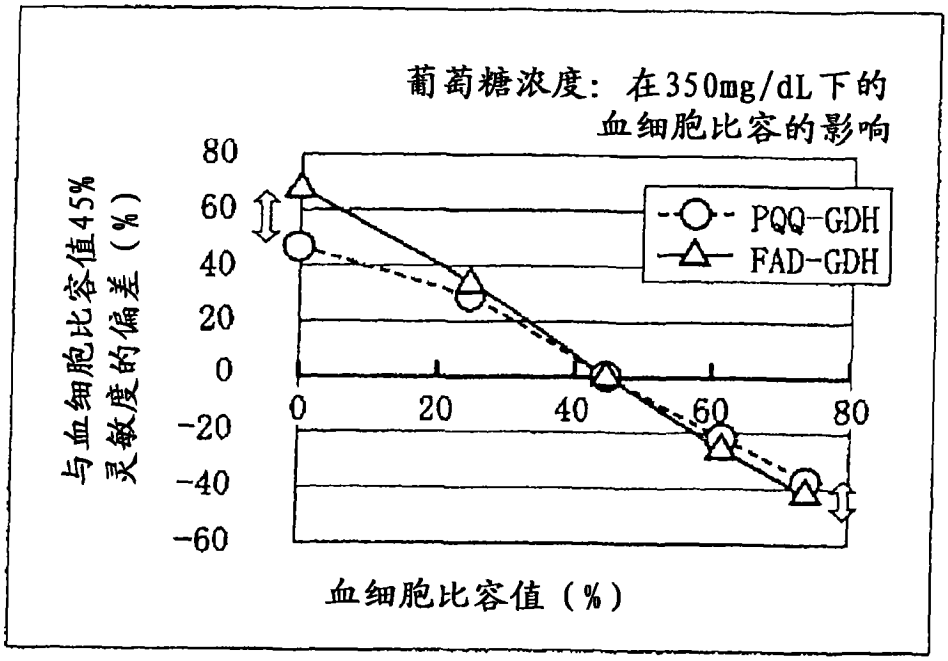

20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
电流值(μA)
0
200
400
600
800
葡萄糖浓度(mg/dl)
无糖醇
麦芽糖醇5mM
麦芽糖醇10mM
乳糖醇5mM
乳糖醇10mM

图 7

(a)


葡萄糖浓度：在350mg/dL下的
血细胞比容的影响
与血细胞比容值45%
灵敏度的偏差（%）
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
0
20
40
60
80
PQQ-GDH
FAD-GDH
血细胞比容值（%）

(b)

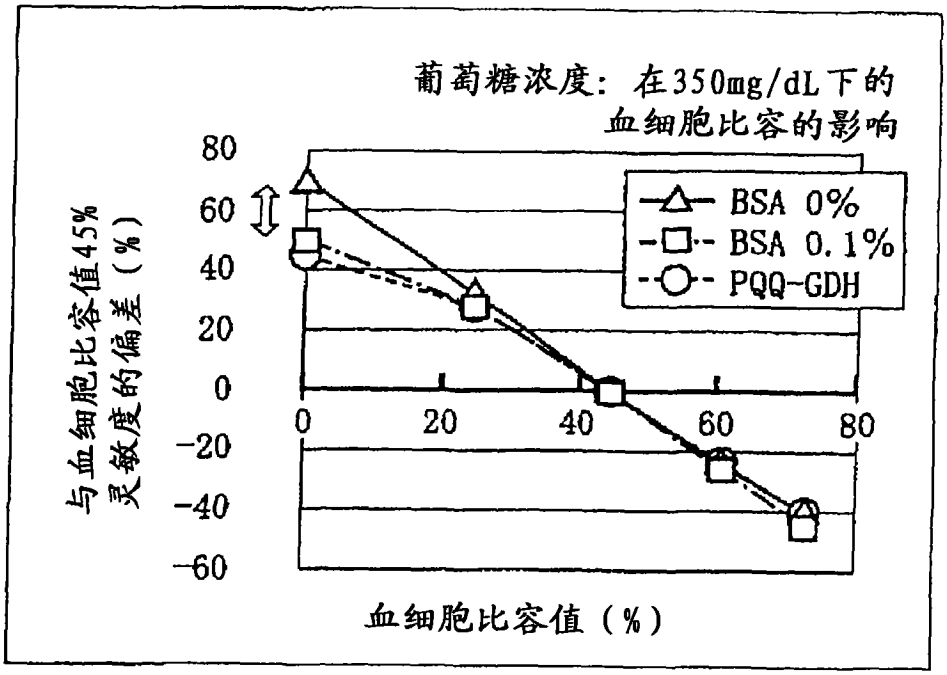

葡萄糖浓度：在350mg/dL下的
血细胞比容的影响
与血细胞比容值45%
灵敏度的偏差（%）
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
0
20
40
60
80
BSA 0%
BSA 0.1%
PQQ-GDH
血细胞比容值（%）

图 8