

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01809045.1

[45] 授权公告日 2007 年 9 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100339701C

[22] 申请日 2001.7.17 [21] 申请号 01809045.1

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 24 [33] JP [31] 222266/00

[86] 国际申请 PCT/JP2001/006188 2001.7.17

[87] 国际公布 WO2002/008743 日 2002.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2002.11.4

[73] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本国大阪府门真市

[72] 发明人 谷池優子 池田信 南海史朗

[56] 参考文献

JP9159642A 1997.6.20

EP0685737A1 1995.12.6

WO9835225A1 1998.8.13

EP0964059A2 1999.12.15

US5437999A 1995.8.1

JP102874A 1998.1.6

JP200065777A 2000.3.3

审查员 王树玲

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 沈昭坤

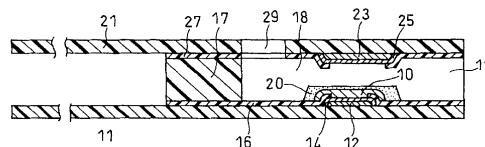
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 10 页

[54] 发明名称

生物传感器

[57] 摘要

本发明提供测定中所需要的样品量少、且高灵敏度的生物传感器。这种生物传感器，包括：具有作用极的第 1 绝缘性基板、具有与上述作用极相对的对极的第 2 绝缘性基板、至少含有氧化还原酶的试剂层、以及形成在第 1 及第 2 绝缘性基板间的试样供给通道，上述作用极、对极及试剂层露出在上述试样供给通道内，且上述作用极与上述对极间的距离小于 150 μm 。



1. 一种生物传感器，其特征在于，

其中包括：具有作用极的第1绝缘性基板、具有与上述作用极相对的对极的第2绝缘性基板、至少含有氧化还原酶的试剂层、以及形成在第1及第2绝缘性基板间的试样供给通道，上述作用极、对极及试剂层露出在上述试样供给通道内，上述对极的试样供给通道内露出部分的面积，小于上述作用极的试样供给通道内露出部分的面积。

2. 如权利要求1所述的生物传感器，其特征在于，

上述作用极与上述对极间的距离在 $150\mu\text{m}$ 以下。

3. 如权利要求1所述的生物传感器，其特征在于，

上述作用极的试样供给通道内露出部分的面积为 $0.1\sim 2.0\text{mm}^2$ ，上述对极的试样供给通道内露出部分的面积为 0.05 以上且未满足 2.0mm^2 。

4. 如权利要求2所述的生物传感器，其特征在于，

上述作用极与上述对极间的距离在 $40\mu\text{m}$ 以上。

5. 如权利要求1所述的生物传感器，其特征在于，

在第1及第2绝缘性基板间，插入有缝隙的隔板，在上述缝隙的部分形成上述试样供给通道。

生物传感器

技术领域

本发明涉及用于对试样中含有的底物进行迅速、且高精度地进行定量测量的生物传感器。

技术背景

作为蔗糖、葡萄糖等糖类的定量分析法，常用的有旋光计法、比色法、还原滴定法及各种色层分离法等方法。但是，这些方法对糖类都没有特别优异的性能，所以精度很低。这些方法中，旋光计法操作虽简便，但受操作时的温度的影响大。因此，旋光计法不适宜作为一般人在家中进行简易的糖类定量的方法。

近年来，人们利用酶具有的特有的触媒作用，开发出各种类型的生物传感器。

下面，作为试样中的底物的定量法的一例，对葡萄糖的定量法进行说明。

作为电化学的葡萄糖的定量法，一般已知有使用属于酶的葡萄糖氧化酶（EC1.1.3.4：以下缩写为 GOD）及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）。

GOD 以氧作为电子导体，有选择地将底物 β -D-葡萄糖氧化为 D-葡萄糖酸- δ -内酯。当氧存在时，在 GOD 引起的氧化反应过程中，氧被还原为过氧化氢。通过氧电极测量这个氧的减少量，或是通过过氧化氢电极测量过氧化氢的增加量。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成比例，因此可根据氧的减少量及过氧化氢的增加量对葡萄糖进行定量。

按上述方法，通过利用酶反应的特异性，可高精度对试样中的葡萄糖进行定量。但是，如同根据反应过程也能推测那样，存在的缺点是，测量结果受试样中所含氧浓度的影响较大，而且试样中无氧时就不能测量。

因此，开发了一种新型葡萄糖传感器，它不将氧作为电子导体使用，而是将赤盐、二络铁衍生物、醌衍生物等有机化合物及金属络化物作为电子导体使用。在这种传感器中，通过在作用极上对酶反应的结果生成的电子导体

的还原体进行氧化, 根据这个氧化电流量求得试样中含有的葡萄糖浓度。此时, 在对极上, 电子导体的氧化体被还原, 进行生成电子导体的还原体的反应。由于把这样的有机化合物及金属络化物取代氧作为电子导体使用, 能够在电极上以稳定状态正确载有已知量的 GOD 和它们的电子导体, 从而形成试剂层, 还能不受试样中的氧浓度的影响, 对葡萄糖高精度进行定量。又, 由于还可以使含有酶及电子导体的试剂层以接近干燥的状态与电极系形成一体化, 所以以这项技术为基础的一次性葡萄糖传感器近年来引起了人们极大的关注。其中的代表性的例子就是特许公报第 2517153 号所示的生物传感器。在一次性葡萄糖传感器中, 只要将试样注入与测定器连接的可脱卸的传感器, 就能很容易用测定器测定葡萄糖的浓度。

采用上述那样的葡萄糖传感器进行测定, 可容易地以数 μl 数量级的试样量求得试样中的底物浓度。不过, 近年来大家都期望能开发出以低于 $1\mu\text{l}$ 左右及更微量的试样就可进行测定的生物传感器。以往的电化学葡萄糖传感器, 其电极系都毫无例外地配置在同一平面上。为此, 当试样是极微量时, 由于对于电极间的电荷移动、主要是离子移动的阻力变大, 测定结果有时会发生误差。

这里, 提出一种生物传感器的方案, 它的作用极与对极配置在相互相对的位置(特许公开 1999-352093 号公报)。这种类型的传感器, 通过将作用极与对极配置在相互相对的位置, 使作用极一对极间的离子移动变得容易, 根据这些理由, 与以往电极系被配置于同一平面的生物传感器比较, 可以以高精度、且高灵敏度对试样中含有的葡萄糖等底物进行定量。

近年来, 由于要求追求测定中所需要的样品量的更微量化, 人们期望生物传感器进一步提高灵敏度, 使得即使用更微量的样品就能进行测定。

本发明鉴于上述问题, 目的在于提供在测定时所需要的样品量少、且高灵敏度的生物传感器。

本发明的内容

本发明的生物传感器, 其特征是, 其中包括: 具有作用极的第 1 绝缘性基板、具有与上述作用极相对的对极的第 2 绝缘性基板、至少含有氧化还原酶的试剂层、以及形成在第 1 及第 2 绝缘性基板间的试样供给通道, 上述作用极、对极及试剂层露出在上述试样供给通道, 且上述作用极与上述对极间的距离小于 $150\mu\text{m}$ 。

这里，对极的试样供给通道内露出部分的面积，最好等于或小于作用极的试样供给通道内露出部分的面积，而且上述对极位于上述作用极的正上方。

作用极的试样供给通道内露出部分的面积 S_1 为 $0.01\sim 20\text{mm}^2$ ，为 $0.1\sim 2.0\text{mm}^2$ 则更好，对极的试样供给通道内露出部分的面积 S_2 为 $0.005\sim 20\text{mm}^2$ ，为 $0.05\sim 2.0\text{mm}^2$ 则更好，最好为 $S_2 \leq S_1$ 。

这里，最好具有在第 1 及第 2 基板间夹有隔板部件的结构。

附图的简单说明

图 1 是本发明的一实施形态中的葡萄糖传感器除去试剂层及表面活性剂层的分解立体图。

图 2 是上述葡萄糖传感器的纵剖面图。

图 3 是本发明的另一实施形态中的葡萄糖传感器除去试剂层及表面活性剂层的分解立体图。

图 4 是本发明的又另一实施形态中的葡萄糖传感器除去试剂层及表面活性剂层的分解立体图。

图 5 是上述葡萄糖传感器的纵剖面图。

图 6 是本发明的又另一实施形态中的葡萄糖传感器除去试剂层及表面活性剂层的分解立体图。

图 7 是上述葡萄糖传感器的纵剖面图。

图 8 是比较例中的葡萄糖传感器除去试剂层及表面活性剂层的分解立体图。

图 9 是上述葡萄糖传感器的纵剖面图。

图 10 所示为本发明实施例 1 的葡萄糖传感器的试样供给通道高度与响应电流值（比）之间关系的曲线图。

图 11 所示为本发明实施例 2 的葡萄糖传感器的作用极一对极间距离与响应电流值（比）之间关系的曲线图。

图 12 所示为本发明实施例 3 的葡萄糖传感器的作用极一对极间距离与响应电流值（比）之间关系的曲线图。

实施本发明的最佳形态

如上所述，本发明的生物传感器，其中包括：具有作用极的第 1 绝缘性基

板、具有与上述作用极相对的对极的第2绝缘性基板、至少含有氧化还原酶的试剂层、以及形成在第1及第2绝缘性基板间的试样供给通道，上述作用极、对极及试剂层露出在上述试样供给通道内，且上述作用极与上述对极间的距离小于 $150\mu\text{m}$ 。作用极与对极的距离以 $40\sim 150\mu\text{m}$ 为好，为 $40\sim 100\mu\text{m}$ 则更好。

本发明的生物传感器，利用毛细管作用被吸入上述试样供给通道内的试样液量以 $10\text{nl}\sim 5\mu\text{l}$ 为好，为 $50\text{nl}\sim 500\text{nl}$ 则更好。

这样一来，在作用极与对极间电荷容易移动，同时抑制作用极上的氧化还原种的扩散层的范围，扩散层中的氧化还原种浓度梯度被维持在高的状态，通过这样传感器的响应增加。

这里，最好对极的试样供给通道内露出部分的面积 S_2 等于或小于作用极的试样供给通道内露出部分的面积 S_1 ，而且对极的位置处于作用极的正上方。这里，所谓对极位于作用极的正上方，意思是从作用极的垂直方向看，使得形成的整个对极与作用极重叠。

在一般的电化学领域的测量系统中，把对极的面积做得大于作用极的面积，使得对极中的反应不受约束。但是，在本发明的生物传感器中，由于对极与作用极配置在相对的位置上，因此如对极的面积做得等于或小于作用极的面积，那么与对极的面积大于作用极的面积的情况比较，可以认为由于对极上的电流密度较高，在对极附近的氧化还原种的浓度就高。由于传感器响应取决于在对极附近的氧化还原种的浓度，因此结果是可以对底物进行高灵敏度定量。又，由于随着对极的面积减少，可减少试样供给通道的容积，因此能够减少样品量。对极的面积最好小于作用极的面积。这样，上述效果就更加显著。

最好在第1绝缘性基板上形成作用极，在第2绝缘性基板上形成对极。这样，生物传感器的制造工艺简单。

这里，第1基板与第2基板之间在构造上最好夹有隔板。这样，由于对于作用于基板的物理压力的强度增加，因此可防止由作用极与对极的接触引起的短路，同时还能降低物理压力对电流响应的影响。

作为本发明的第1及第2基板，可采用有电绝缘性、在保存及测定时有足够刚性的材料。例如，聚乙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚酰胺、饱和聚脂树脂等热可塑性树脂、尿素树脂、蜜胺树脂、苯酚树脂、环氧树脂、不饱和聚脂树脂等热硬化性树脂等。其中从与电极的附着性方面衡量，数聚对苯二甲酸乙二醇酯好。

作为隔板部件，可采用有电绝缘性、在保存及测定时有足够刚性的材料。例如聚乙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚酰胺、饱和聚脂树脂等热可塑性树脂，尿素树脂、蜜胺树脂、苯酚树脂、环氧树脂、不饱和聚脂树脂等热硬化性树脂等。

作为作用极，可采用将电子导体氧化时其本身不被氧化的导电性材料。作为对极，可采用钽、金、铂、碳等通常所用的导电性材料。

作为氧化还原酶，可采用与试样中所含的测定对象的底物相对应的材料。例如果糖脱氢酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖脱氢酶、醇氧化酶、乳酸氧化酶、胆固醇氧化酶、植物黄质氧化酶、氨基酸氧化酶等。

本发明的生物传感器，最好试剂层中含有电子导体。作为电子导体，可举出赤盐、p-苯醌、N-甲基吩嗪(硫酸单甲酯)盐(Phenazine methosulfate)，甲烯蓝、二络铁衍生物等。又，在以氧作为电子导体的情况下，也能得到电流响应。电子导体可使用它们中的一种或二种以上。

本发明的生物传感器，最好在试剂层中含有亲水性高分子。作为亲水性高分子，可以采用各种材料。例如可列举：羟基乙基纤维素、羟基丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、乙基羟基乙基纤维素、羧甲基纤维素、聚烯吡酮、聚乙烯乙醇、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、无水马来酸或它的盐的聚合物。其中数羧甲基纤维素，羟基乙基纤维素，及羟基丙基纤维素最好。

下面参照附图，对本发明的实施形态作详细说明。在所示构造的附图中，各要素的相对位置及尺寸不一定正确。

实施形态 1

作为生物传感器的一个例子，下面对葡萄糖传感器进行说明。

用图 1 及图 2 来说明本实施形态。图 1 是本实施形态中的葡萄糖传感器除去试剂层及表面活性剂层的分解立体图。图 2 是它的纵剖面图。

11 表示由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的第 1 绝缘性基板。在这个基板 11 上，通过丝网印刷印上银浆，形成作用极的引线 12 及电极的基底，然后，将含树脂粘合剂的导电性碳糊印刷到电极的基底上，形成作用极 14。这个作用极 14 与作用极引线 12 接触。在基板 11 上，印刷上绝缘性糊浆，形成绝缘层 16。绝缘层 16 覆盖作用极 14 的外周，以此使作用极 14 的露出部分面积保持一定。

下面，在第2绝缘性基板21的背面印刷银浆，形成对极引线23及电极的基底，然后将导电性碳糊印刷到上述电极的基底上，以形成对极25。接着印刷绝缘性糊浆形成绝缘层27，使得对极25的露出部分的面积大于作用极14的露出部分的面积。基板21上形成气孔29。

将含有酶的GOD及电子传导体的赤盐的水溶液滴到基板11的作用极14上以后，经干燥形成试剂层10。又，在试剂层10上，形成含有表面活性剂的卵磷脂的表面活性剂层20。

最后，按照图1中点划线表示的位置关系，将基板11、基板21、及隔板部件17进行粘接，遂组装成如图2所示的葡萄糖传感器。

夹在基板11与基板21间的隔板部件17，具有缝隙18，这个缝隙18在基板11与基板21间形成作为试样供给通道的空间。通过改变这个隔板部件17的厚度，可改变试样供给通道的高度即作用极14与对极35之间的距离。

由于基板21的气孔29与上述试样供给通道连通，所以如果在缝隙18开放端形成的试样供给口19处让试样接触，则利用毛细管现象，试样很容易到达试样供给通道内的试剂层10。

实施形态2

图3是本实施形态中的葡萄糖传感器除去试剂层及表面活性剂层的分解立体图。在本实施形态中，将对极25a做得与作用极14一样呈四边形，它的面积与作用极的面积相等。其它与实施形态1一样。

实施形态3

图4是本实施形态中的葡萄糖传感器除去试剂层及表面活性剂层的立体图。图5是它的纵剖面图。

这个葡萄糖传感器以下列步骤制成。

首先，在两侧具有垂直片37及37的绝缘性基板31上溅射钯，形成作用极34及其引线32。然后，将绝缘性部件36贴在基板31上，通过这样对作用极34及插入测定器的引线32的端子部进行固定。另一方面，在第2绝缘性基板41的内表面，同样通过溅射钯制成对极45及对极引线43。然后，将绝缘性部件47贴在基板41的内表面，对对极45及插入测定器的引线43的端子部进行固定。

接着，将第2基板与基板31粘接。此时，作用极34与对极45配置于在相对的位置，当中隔着基板31与基板41间形成的空间。作用极与对极间的距离，例如做成 $100\mu\text{m}$ 。形成的试剂层30及表面活性剂层40与实施形态1相同，将电极34覆盖。这样制成的传感器，接近电极34及45处的端面就成了试样供给口39。由此供给的试样利用与气孔49连通的空间的毛细管作用，到达电极部。

实施形态4

图6是本实施形态中的葡萄糖传感器除去试剂层及表面活性剂层的立体图。图7是它的纵剖面图。

这个葡萄糖传感器以下列步骤制成。

在第1绝缘性基板51上溅射钯，以形成作用极54及其引线52。然后，将绝缘性部件56贴在基板51上，通过这样对作用极54及插入测定器的引线52的端子部进行固定。另一方面，在外侧具有鼓出曲面部68的第2绝缘性基板61的曲面部68的内壁面上，通过溅射钯形成对极65及其引线63。通过调节曲面部68的曲率，可控制作用极54与对极65之间的距离。

然后，将绝缘性部件67贴在基板61的内壁面，通过这样对对极65及插入测定器的端子部进行固定。此时，使得对极65的面积与作用极54的面积相等。对极65的端子部在基板61的后端61a的背面露出。在曲面部68的端部有气孔69。在作用极54上形成试剂层50，又，再形成表面活性剂层60，将它覆盖。最后，使基板51与基板61粘合，组装成葡萄糖传感器。

实施例1

在实施形态1中，通过改变隔板部件17的厚度，制成试样供给通道高度不同的5种传感器。作用极的面积为 1.0mm^2 。对极是直径约为 3.6mm 的圆形，由于它的直径大于隔板部件17的缝隙18的幅度，所以在试样供给通道内有一部分未露出。对极的试样供给通道内露出部分的面积约为 5.3mm^2 。

作为比较例，制成在同一极板上具有作用极与对极的葡萄糖传感器。与实施例1一样，制成试样供给通道高度不同的5种葡萄糖传感器。图8是比较例中的传感器除去试剂层及表面活性剂层的分解立体图。图9是它的纵剖面图。

在由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的绝缘性基板101上，通过丝网印刷印上

银浆，形成作用极引线 102 及对极引线 103，然后，印刷含树脂粘合剂的导电性碳糊，形成作用极 104。这个作用极 104 与作用极引线 102 接触。又，在基板 101 上，印刷绝缘性浆体，形成绝缘层 106。绝缘层 106 覆盖作用极 104 的外周，以此使作用极 104 的露出部分面积保持一定。接着，在基板 101 上印刷含树脂粘合剂的导电性碳糊，使之与对极引线 103 接触，以形成对极 105。作用极 104 的面积约为 1.0 mm^2 ，对极 105 的试样供给通道内露出部分的面积约为 4.3 mm^2 。

将含酶的 GOD 及电子传导体的赤盐的水溶液滴到作用极 104 及对极 105 上后，经干燥形成试剂层 107，在这个试剂层 107 上，形成含有表面活性剂的卵磷脂的表面活性剂层 109。按照图 8 中点划线表示的位置关系，将这些基板 101、具有气孔 114 的盖板 112、以及具有缝隙 111 的隔板部件 110 进行粘接。

采用上述的实施例 1 及比较例的传感器，对含一定量的葡萄糖的水溶液进行葡萄糖浓度的测定。将试样从试样供给口送入试样供给通道，经过一定时间后，以对极为基准，在作用极上加上 500mV 的电压。利用加上的这个电压，来测定在作用极与对极间流动的电流值，观察与试样中的葡萄糖浓度成比例的电流响应。

对于葡萄糖含量为 $180 \text{ mg} / \text{dl}$ 的溶液，利用试样供给通道高度不同的各葡萄糖传感器，测定响应电流值。图 10 所示为实施例 1 的传感器的试样供给通道高度与响应值（比）之间关系的曲线图。响应值（比）表示将利用试样供给通道高度相等的比较例的传感器得到的响应值作为 100 之比。

从图 10 可以看出，如果试样供给通道的高度小于 $150 \mu\text{m}$ ，则实施例 1 相对于比较例的响应值（比）将急剧增加。这可以认为是由于，作用极与对极相互相对，如作用极与对极间的距离小于 $150 \mu\text{m}$ ，则作用极上氧化还原种的扩散层的成长被抑制，对极上的氧化还原种的浓度反映传感器响应，以及作用极与对极之间的电荷能很好移动等导致的结果。

又，在实施例 1 中，测定所需要的样品量约为 $0.5 \sim 3.0 \mu\text{l}$ 。按照本发明这样，由于作用极与对极间的距离受到限制，因此，能够减少测定所需要的样品量。

实施例 2

实施形态 2 中，作用极与对极的面积都是 1.0 mm^2 ，此外，采用与实施例 1

同样的方法来制成生物传感器。然后，对于含葡萄糖为 90 mg / dl 的溶液，利用试样供给通道高度不同的各葡萄糖传感器，测定响应电流值。图 11 所示为实施例 2 的传感器的试样供给通道的高度、即作用极一对极间距离与响应值（比）之间关系的曲线图。响应值（比），表示将利用试样供给通道高度相等的实施例 1 的传感器得到的响应值作为 100 之比。

从图 11 可以看出，如果试样供给通道的高度小于 150 μm ，实施例 2 的传感器相对于实施例 1 的响应值（比）将急剧增加。这可以认为是由于，作用极与对极相互相对，如作用极与对极间的距离小于 150 μm ，则作用极上氧化还原种的扩散层的成长被抑制，对极上的氧化还原种的浓度反映传感器响应，以及作用极与对极之间的电荷能很好移动等导致的结果。

在一般的电化学中，为防止约束对极中的反应，对极的面积做得比作用极的面积大。但是，由于作用极与对极相对配置，因此对极上的电流密度反映电流响应，由于这些理由，比之对极的面积大于作用极的面积的情况，可得到高响应电流。

在本实施例中，由于对极的面积与作用极的相等，气孔 29 的位置比实施例 1 更接近试样供给口。因此，测定所需要的样品量可进一步减少。

实施例 3

在本实施例中，对极的面积是 0.64 mm^2 ，此外与实施例 2 同样制成生物传感器。然后，对于含葡萄糖为 90 mg / dl 的溶液，利用试样供给通道高度不同的各葡萄糖传感器，测定响应电流值。图 12 所示为实施例 3 的传感器的试样供给通道的高度（作用极一对极间距离）与响应值（比）之间关系的曲线图。响应值（比）表示将利用试样供给通道高度相等的实施例 1 的传感器得到的响应值作为 100 之比。

从图 12 可以看出，如果作用极与对极间的距离小于 150 μm ，本实施例的相对于实施例 1 的响应值（比）将急剧增加。这可以认为是由于与实施例 2 中说明的相同理由之故。

在本实施例中，由于对极的面积小于作用极的面积，气孔的位置比实施例 2 能更接近试样供给口侧。因此，能够比实施例 2 更进一步减少测定所需要的样品量。

产业上利用的可能性

如上所述，通过本发明的技术，可获得测定中所需要的样品量少、且高灵敏度的生物传感器。

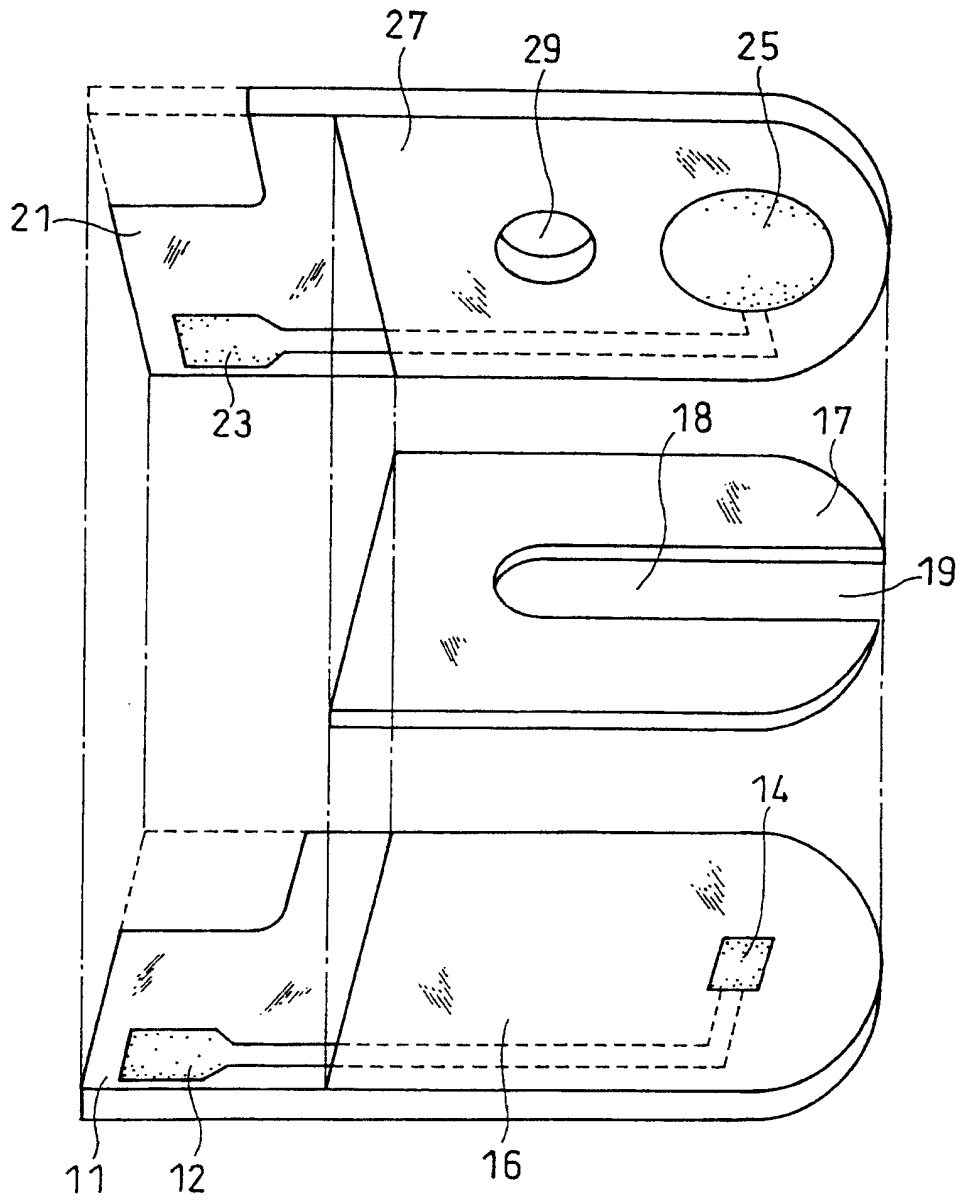


图 1

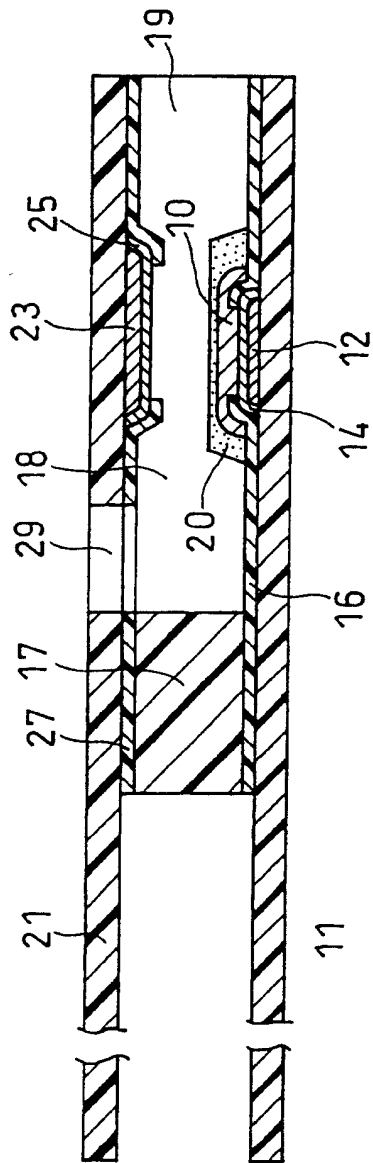


图 2

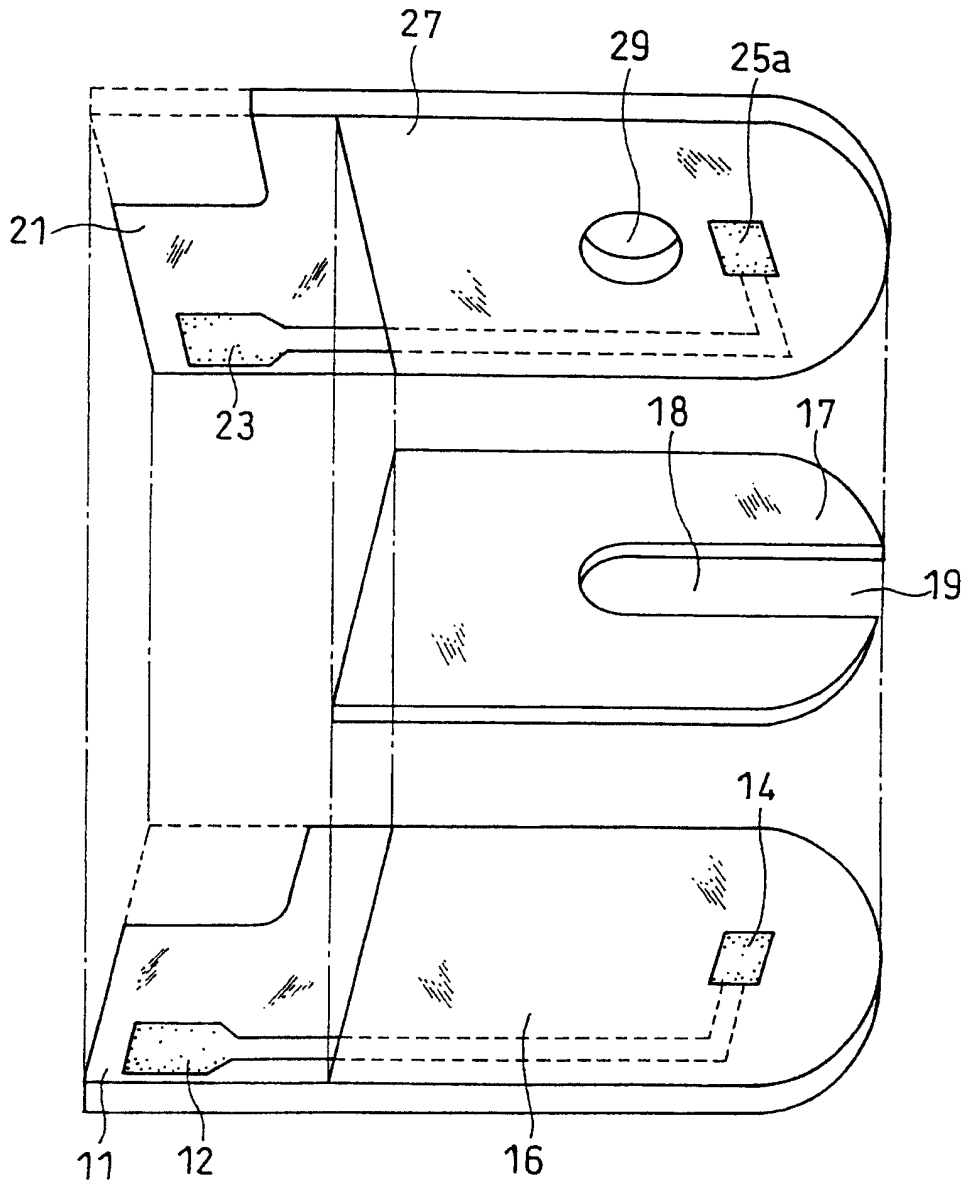


图 3

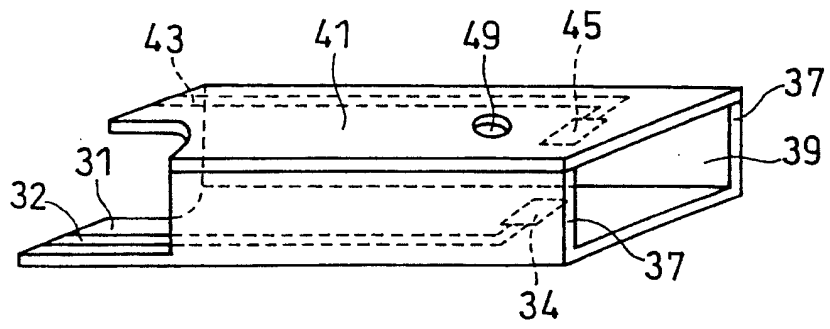


图 4

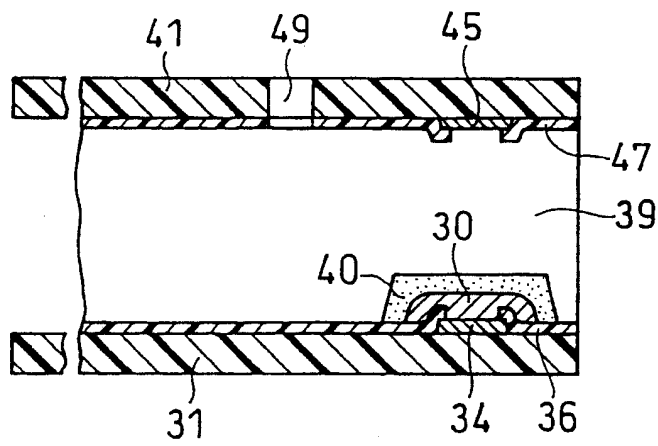


图 5

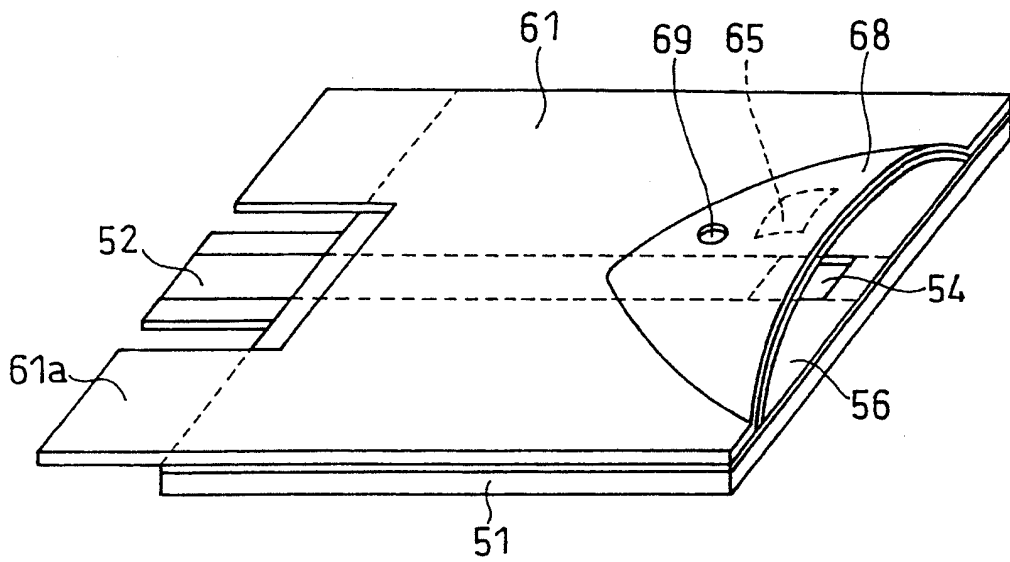


图 6

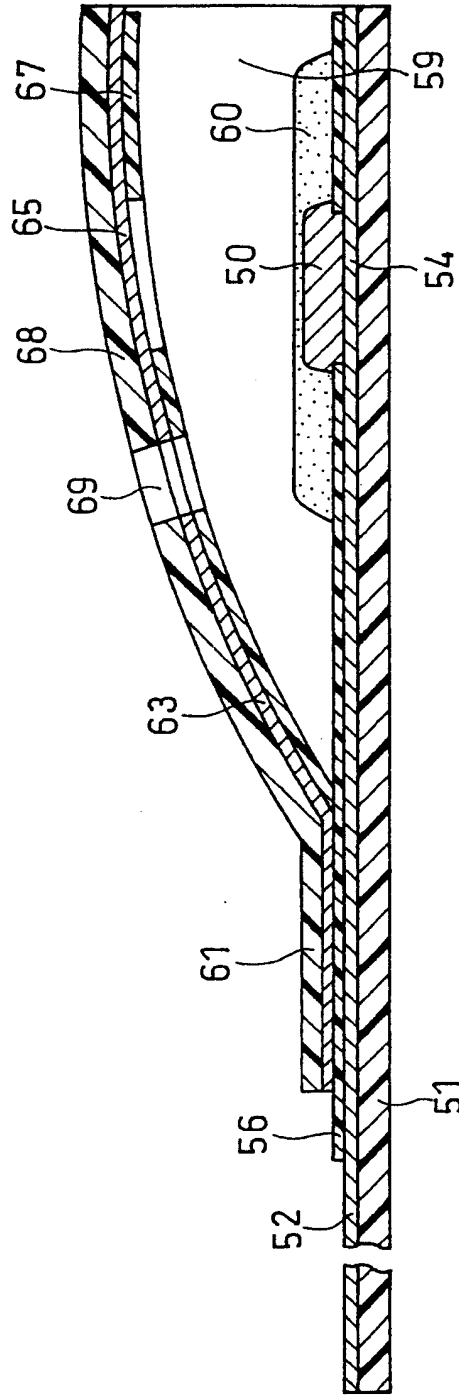


图 7

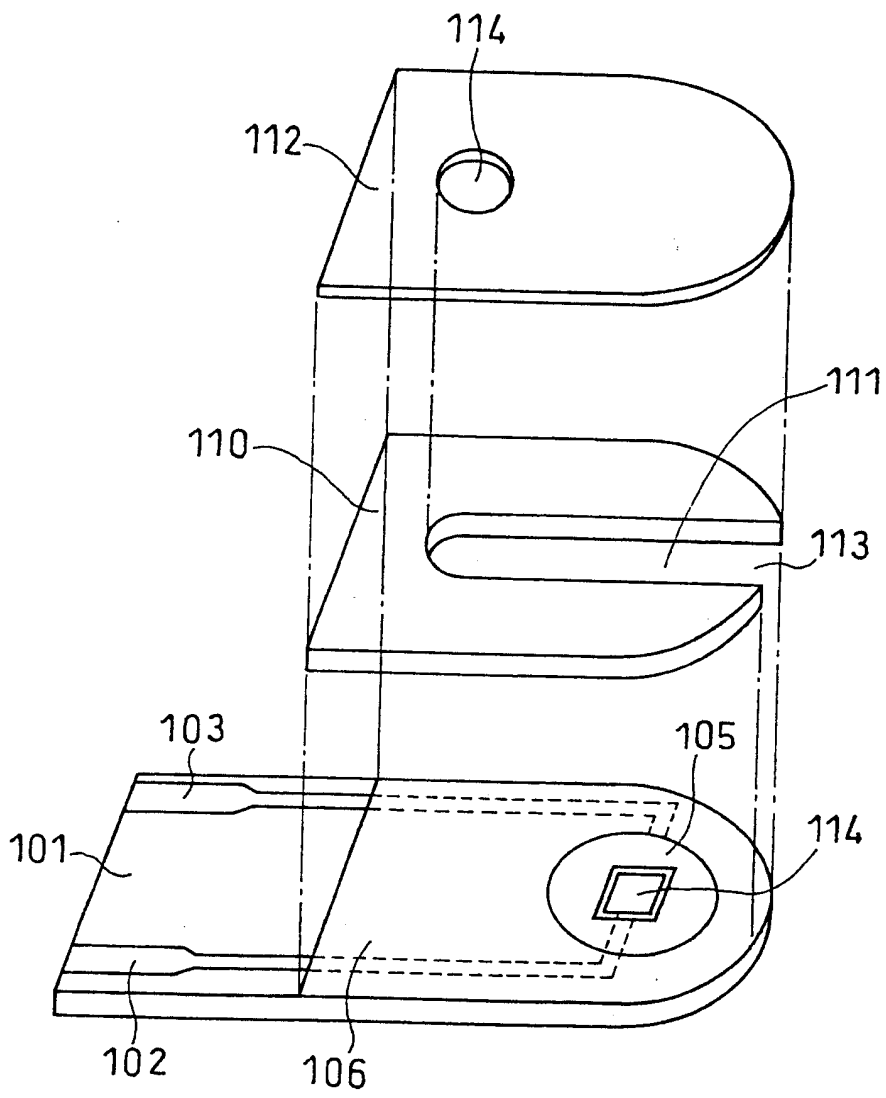


图 8

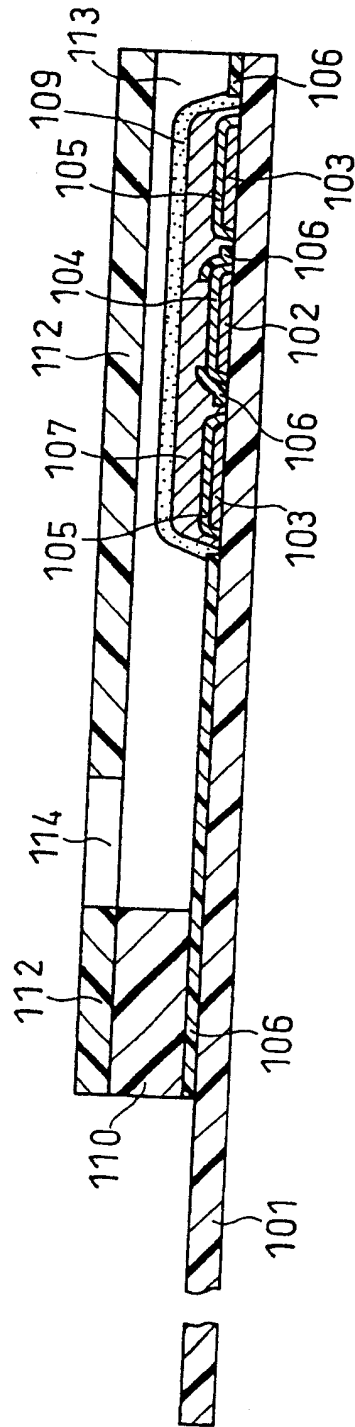


图 9

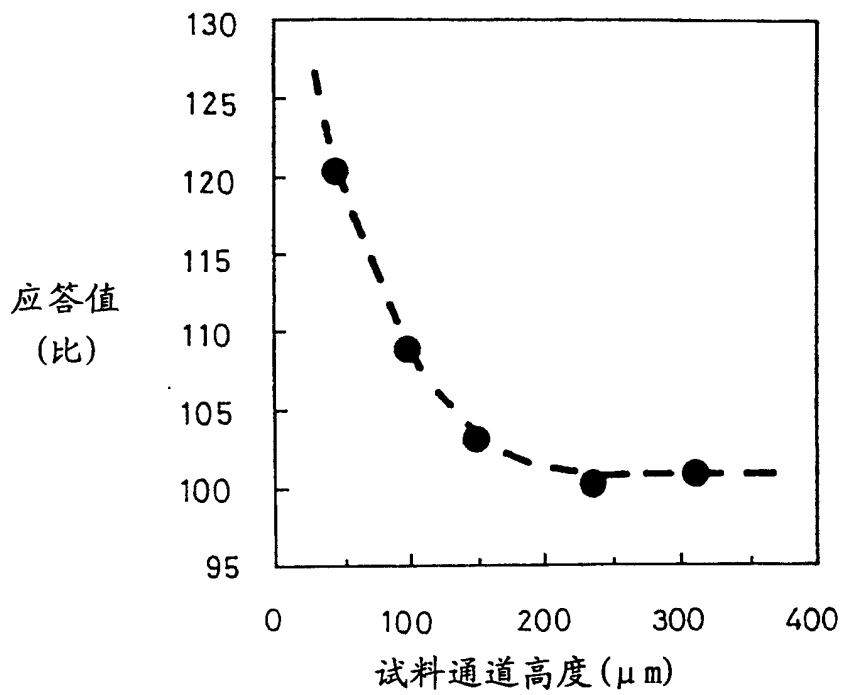


图 10

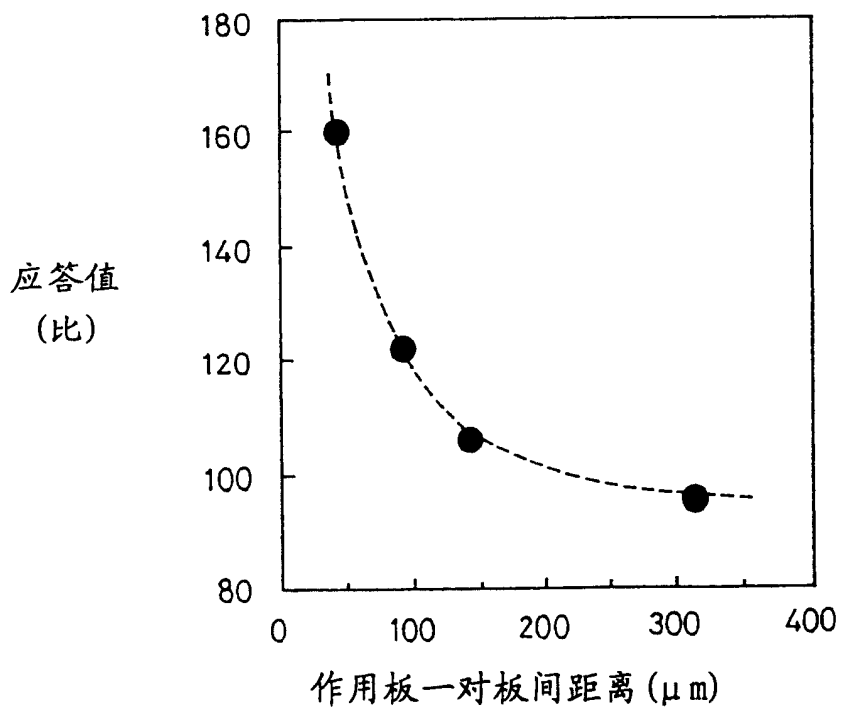


图 11

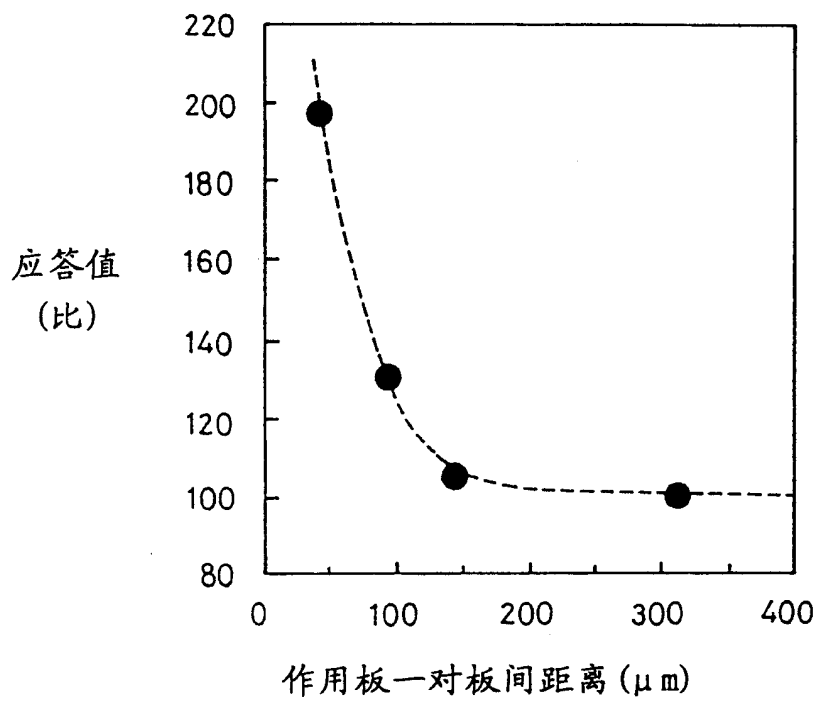


图 12