



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109946352 A

(43)申请公布日 2019.06.28

(21)申请号 201811324809.4

(22)申请日 2018.11.08

(71)申请人 利多(香港)有限公司

地址 中国香港上环德辅道中199号无限极广场12楼55室

(72)发明人 孙玉龙 项新亮 程艳 张莉

(74)专利代理机构 浙江杭州金通专利事务有限公司 33100

代理人 徐关寿

(51) Int. Cl.

G01N 27/26(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

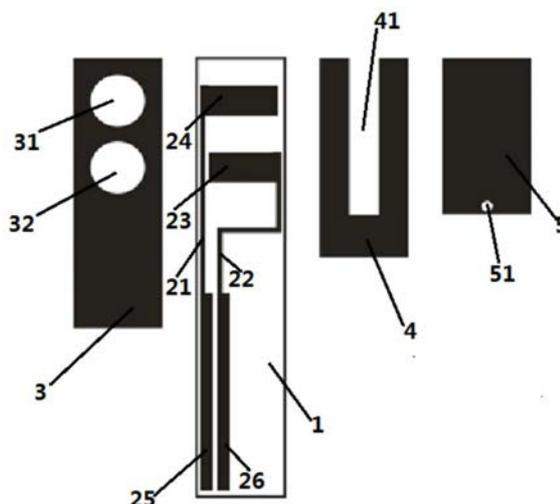
权利要求书1页 说明书14页 附图5页

(54)发明名称

用于电势型生物传感器的反应试剂及其应用

(57)摘要

本发明提供一种反应试剂,用于电势型生物传感器检测样品中尿素浓度,电势型生物传感器包括一个指示电极和一个参比电极,所述反应试剂包括位于所述参比电极上的第一反应试剂和位于所述指示电极上的第二反应试剂,所述第一反应试剂含有电子传递体但不含有脲酶,所述第二反应试剂含有脲酶但不含有电子传递体。在不施加外部电压的情形下,加入血液等样品后,脲酶催化样品中的尿素发生反应,从而导致指示电极和参比电极之间产生电势差,而且指示电极与参比电极之间的电势差与样品中的尿素浓度成线性关系,根据这种线性关系,就可计算出样品中的尿素浓度。



1. 一种反应试剂,用于电势型生物传感器检测样品中尿素浓度,其特征在于,电势型生物传感器包括一个指示电极和一个参比电极,所述反应试剂包括位于所述参比电极上的第一反应试剂和位于所述指示电极上的第二反应试剂,所述第一反应试剂含有电子传递体但不含有脲酶,所述第二反应试剂含有脲酶但不含有电子传递体。

2. 根据权利要求1所述的反应试剂,其特征在于,脲酶浓度为2280U/mL~8712U/mL。

3. 根据权利要求1所述的反应试剂,其特征在于,所述第一反应试剂和第二反应试剂还含有聚合物粘合剂、表面活性剂、缓冲剂和稳定剂。

4. 根据权利要求3所述的反应试剂,其特征在于,所述聚合物粘合剂为纤维素衍生物,其浓度为0.01~10% (W/W);所述表面活性剂选自PEG系列表面活性剂、Tween系列表面活性剂、胆酸钠、CHAP、Triton X-100和十六烷基胆碱,其浓度为0.01%~5% (W/W);所述缓冲剂选自柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液和Tris-HCl缓冲液;所述稳定剂选自糖类物质、糖醇类物质、氨基酸、蛋白和含羧基有机酸,其浓度为0.1%~50%。

5. 根据权利要求1所述的反应试剂,其特征在于,所述电子传递体的浓度为1.0~4.5% (w/w)。

6. 根据权利要求1所述的反应试剂,其特征在于,所述电子传递体为钌化合物;钌化合物的浓度为1.0~4.5% (w/w)。

7. 根据权利要求1-6之一所述的反应试剂在电势型生物传感器上的应用。

8. 根据权利要求1-6之一所述的反应试剂在电势型生物传感器检测样品尿素浓度方法中的应用。

用于电势型生物传感器的反应试剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测样品中尿素浓度的电势型生物传感器的反应试剂,属于电分析化学检测技术领域。

背景技术

[0002] 尿素(urea)是蛋白及其组成成份氨基酸分解代谢的最终产物,不与血浆蛋白结合。在蛋白分解代谢中,蛋白被分解为氨基酸,氨基酸经脱氨基作用形成的氨在肝脏中进入尿素循环与二氧化碳产生尿素。肝脏中产生的尿素主要经肾脏排泄,小部分经汗液排出。在肾脏中,尿素经过肾小球滤过,并随尿液排出体外。如果肾脏功能遭受损伤,那么肾小球滤过率降低,血液中的尿素浓度就会增加。因此,血液中的尿素含量是评估肾功能最为重要的生理指标之一,用于诊断某些肾脏疾病和代谢紊乱疾病。

[0003] 尿素测定是肾功能评价应用最广的实验,它经常和肌酐联合使用来诊断肾前性高尿素血症(心脏代偿失调、脱水、蛋白分解增加)、肾性高尿素血症(肾小球肾炎、慢性肾炎、多囊肾、肾硬化和肾小管坏死)和肾后性高尿素血症(尿路梗阻)。

[0004] 早期的尿素测定方法大多为比色法,如先用脲酶将尿素分解为 NH_4^+ 和 HCO_3^- ,随后根据波氏反应在560nm波长下检测产生的蓝色吡啶酚的吸光度,利用谷氨酸脱氢酶在340nm波长下检测吸光度下降速率,或者利用二乙酰一肟直接与尿素发生缩合反应,在525nm下检测产生的红色二嗪衍生物的吸光度。但是比色法需要使用昂贵的仪器和专业的技术人员,而且操作繁琐,不能够快速地测定出结果,此外,血液中存在内源性干扰物也影响检测结果的准确性。

[0005] 为此,美国专利US5063081A和US7540948B2均采用基于指示电极和参比电极的电势测定法来检测血液中的尿素氮含量(即血液尿素中的氮含量,与血液中的尿素浓度存在着一种确定的换算关系):指示电极由位于顶部的脲酶层(含有足够的脲酶)、位于底部的金属/金属盐导电层以及位于两者之间的膜层组成,其中这种膜层含有 NH_4^+ 选择性离子载体,如无活菌素(nonactin)和恩镰孢菌素(enniatin)等。当加入血液时,脲酶与血液中的尿素发生反应,从而产生 NH_4^+ 、 HCO_3^- 和 OH^- ,仅 NH_4^+ 能够通过 NH_4^+ 选择性离子载体穿过这种膜层,从而导致膜层两侧产生电势差;最后通过测量指示电极和参比电极之间的电势差,来计算样品中的尿素氮含量。然而,这两篇美国专利中的这种电位测量法也存在着明显的不足之处: NH_4^+ 选择性离子载体成本昂贵;根据能斯特方程,在一定的条件下,指示电极和参比电极之间的电势差与血液中的尿素浓度对数成线性关系,依据这一点来计算血液中的尿素浓度,这会导致血液中的尿素浓度计算方法比较复杂;指示电极的结构比较复杂,制造起来较为困难。

[0006] 此外,中国专利申请CN201310308122.2提供一种脲酶电极法检测尿素氮的试剂,但是它的检测原理是基于电势与溶液中给定离子活动度的对数的线性关系,测定溶液中离子的浓度,然后计算出溶液中的尿素氮含量。这种计算方法比较复杂。此外,由于涉及利用脲酶电极计算溶液中的给定离子浓度,因此检测结果容易受到溶液中其他离子的干扰。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足之处,本发明提供一种用于电势型生物传感器的反应试剂,该电势型生物传感器含有指示电极和参比电极,指示电极不含有 NH_4^+ 选择性离子载体,参比电极上的第一反应试剂包括钌化合物(如三氯化六铵合钌)但不包含脲酶,而指示电极上的第二反应试剂包括脲酶但不包括钌化合物。令人意料之外的是,在不施加外部电压的情形下,加入血液等样品后,脲酶催化样品中的尿素发生反应,从而导致指示电极和参比电极之间产生电势差,而且指示电极与参比电极之间的电势差与样品中的尿素浓度成线性关系。

[0008] 本发明的目的在于提供一种反应试剂,用于电势型生物传感器检测样品中尿素浓度,电势型生物传感器包括一个指示电极和一个参比电极,所述反应试剂包括位于所述参比电极上的第一反应试剂和位于所述指示电极上的第二反应试剂,所述第一反应试剂含有电子传递体但不含有脲酶,所述第二反应试剂含有脲酶但不含有电子传递体。

[0009] 进一步地,所述脲酶浓度为2280U/mL~8712U/mL。

[0010] 进一步地,所述第一反应试剂和第二反应试剂还含有聚合物粘合剂、表面活性剂、缓冲剂和稳定剂。

[0011] 进一步地,所述聚合物粘合剂为纤维素衍生物,其浓度为0.01~10% (W/W);所述表面活性剂选自PEG系列表面活性剂、Tween系列表面活性剂、胆酸钠、CHAP、Triton X-100和十六烷基胆碱,其浓度为0.01%~5% (W/W);所述缓冲剂选自柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液和Tris-HCl缓冲液;所述稳定剂选自糖类物质、糖醇类物质、氨基酸、蛋白和含羧基有机酸,其浓度为0.1%~50%。

[0012] 进一步地,所述电子传递体的浓度为1.0~4.5% (w/w)。

[0013] 进一步地,所述电子传递体为钌化合物;钌化合物的浓度为1.0~4.5% (w/w)。

[0014] 进一步地,本发明还包括所述反应试剂在电势型生物传感器上的应用。

[0015] 进一步地,本发明还包括所述反应试剂在电势型生物传感器检测样品尿素浓度方法中的应用。

[0016] 本发明的目的还在于提供一种电势型生物传感器,具有一个加样端和一个电连接端,所述电势型生物传感器包括绝缘基底、导电层、反应区域形成层、通道形成层和上盖层;

[0017] 所述导电层设置在所述绝缘基底上,包括位于所述电连接端的第一触点和第二触点、位于所述加样端的一个指示电极和一个参比电极、将所述参比电极和所述第一触点连接在一起的第一导电迹线以及将所述指示电极和所述第二触点连接在一起的第二导电迹线;

[0018] 所述反应区域形成层覆盖在所述电极系统上,具有分隔开的第一反应孔和第二反应孔,所述第一反应孔暴露所述参比电极的至少一部分区域并在所述参比电极上形成第一反应区域,所述第二反应孔暴露所述指示电极的至少一部分区域并在所述指示电极上形成第二反应区域;

[0019] 所述通道形成层设置在所述反应区域形成层上,在所述加样端上设置一个开口,所述开口同时暴露所述第一反应区域的至少一部分区域和所述第二反应区域的至少一部分区域;

[0020] 所述上盖层设置在所述通道形成层上,具有一个通气孔,所述上盖层与所述开口、所述反应区域形成层和所述绝缘基板一起形成一个样品通道,所述通气孔位于所述样品通

道的上方,一个加样口设置在所述加样端中,样品通过所述加样口进入所述样品通道;

[0021] 第一反应试剂位于所述第一反应区域上,含有电子传递体但不含有脲酶,第二反应试剂位于所述第二反应区域上,含有脲酶但不含有电子传递体。

[0022] 进一步地,所述反应区域形成层是通过丝网印刷方法将疏水性的绝缘材料印在所述绝缘基板上形成的,在进行丝网印刷时,所述绝缘基板的部分区域不印刷绝缘材料,从而在所述反应区域形成层上产生分隔开的所述第一反应孔和所述第二反应孔。

[0023] 进一步地,所述开口的宽度为1.0~2.5mm。

[0024] 进一步地,所述第二反应区域和所述第一反应区域的宽度大约为所述开口宽度的2~3倍。

[0025] 进一步地,所述第一反应试剂和第二反应试剂还含有聚合物粘合剂、表面活性剂、缓冲剂和稳定剂。

[0026] 进一步地,所述聚合物粘合剂为纤维素衍生物,其浓度为0.01~10% (W/W);所述表面活性剂选自PEG系列表面活性剂、Tween系列表面活性剂、胆酸钠、CHAP、Triton X-100和十六烷基胆碱,其浓度0.01%~5% (W/W);所述缓冲剂选自柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液和Tris-HCl缓冲液;所述稳定剂选自糖类物质、糖醇类物质、氨基酸、蛋白和含羧基有机酸,其浓度为0.1%~50%。

[0027] 进一步地,所述电子传递体选自钌化合物、铁氰化钾或亚铁氰化钾。

[0028] 进一步地,所述电子传递体的浓度为1.0~4.5% (w/w)。

[0029] 进一步地,所述电子传递体为钌化合物。

[0030] 进一步地,所述脲酶浓度为2280U/mL~8712U/mL。

[0031] 进一步地,在所述参比电极和所述指示电极的一侧或两侧设置至少一个辅助扩散组件。

[0032] 进一步地,所述辅助扩散组件是由导电的碳油墨制造出来的多孔材料。

[0033] 进一步地,在所述参比电极的一侧或两侧设置的每个辅助扩散组件部分地覆盖着所述第一反应区域,在所述指示电极的一侧或两侧设置的每个辅助扩散组件部分地覆盖着所述第二反应区域。

[0034] 进一步地,与所述参比电极的两个相对侧边中的任意一个侧边距离最近的一个辅助扩散组件与所述参比电极之间的间隔距离以及与所述指示电极的两个相对侧边中的任意一个侧边距离最近的一个辅助扩散组件与所述指示电极之间的间隔距离均为0.1~0.5mm。

[0035] 本发明的目的还在于提供一种检测样品中尿素浓度的方法,提供电势型生物传感器,具有一个加样端和一个电连接端,电势型生物传感器包括位于电连接端的第一触点和第二触点,包括加样端的一个指示电极和一个参比电极,所述反应试剂包括位于所述参比电极上的第一反应试剂和位于所述指示电极上的第二反应试剂,所述第一反应试剂含有电子传递体但不含有脲酶,所述第二反应试剂含有脲酶但不含有电子传递体;加样口设置在加样端中,该方法包括以下步骤:

[0036] (1) 将电势型生物传感器通过第一触点和第二触点插入到一种检测仪器的电连接器中;

[0037] (2) 将样品加入到电势型生物传感器的加样口中,并让样品与第一反应试剂和第

二反应试剂发生化学反应；

[0038] (3) 采用开路电势法检测指示电极和参比电极之间的电势差，鉴于检测到的电势差与样品中的尿素浓度直接成线性关系，可根据电势差确定样品中的尿素浓度。

[0039] 进一步地，所述脲酶浓度为2280U/mL~8712U/mL。

[0040] 进一步地，所述第一反应试剂和第二反应试剂还含有聚合物粘合剂、表面活性剂、缓冲剂和稳定剂；所述聚合物粘合剂为纤维素衍生物，其浓度为0.01~10% (W/W)；所述表面活性剂选自PEG系列表面活性剂、Tween系列表面活性剂、胆酸钠、CHAP、Triton X-100和十六烷基胆碱，其浓度为0.01%~5% (W/W)；所述缓冲剂选自柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液和Tris-HCl缓冲液；所述稳定剂选自糖类物质、糖醇类物质、氨基酸、蛋白和含羧基有机酸，其浓度为0.1%~50%。

[0041] 进一步地，所述电子传递体选自钌化合物、铁氰化钾或亚铁氰化钾。

[0042] 进一步地，所述电子传递体的浓度为1.0~4.5% (w/w)。

[0043] 进一步地，所述电子传递体为钌化合物。

[0044] 本发明的有益效果：(1) 本发明并不使用现有技术中的成本高昂的 NH_4^+ 选择性离子载体，从而使得检测成本大幅下降，同时这也让指示电极的结构更加简单，便于大规模制造；(2) 现有的检测方法考虑的是所产生的电势差与样品尿素浓度的对数值成线性关系，或者在加入样品中，在指示电极和参比电极之间施加电压后，所产生的电流值与样品中的尿素浓度之间的线性关系，然而，在本发明所提供的电势型生物传感器中，指示电极上含有脲酶，但不含有电子传递体，而参比电极上含有电子传递体但不含有脲酶，在不施加外部电压的情形下，加入样品后，如果样品含有尿素的话，那么脲酶催化样品中的尿素发生反应，并导致指示电极和参比电极之间产生电势差，而且所产生的电势差与样品中的尿素具有良好的线性关系，计算样品中的尿素浓度，因此本发明对样品中的尿素检测更加简单，不用采用更加复杂的计算步骤和电路设计，检测结果更加准确；(3) 本发明的检测结果具有很好的抗HCT(红细胞压积)干扰能力：在相同的尿素浓度下，红细胞压积在30%的情形下和在60%的情形下的电势差测量值，与红细胞压积在42%的情形下的电势差测量值相差幅度都在10%以内，因此HCT对检测结果的干扰比较小。

附图说明

[0045] 图1. 本发明的电势型生物传感器的一个实施例的分解图。

[0046] 图2. 本发明的电势型生物传感器的另一个实施例的分解图。

[0047] 图3. 本发明的电势型生物传感器的一个实施例的侧面示意图。

[0048] 图4. 本发明的电势型生物传感器的一个实施例的整体结构示意图。

[0049] 图5表示至少一个辅助扩散组件在指示电极两侧的多种分布方式，其中(a)表示指示电极的下侧具有一个辅助扩散组件；(b)指示电极的两侧(上侧和下侧)都具有一个辅助扩散组件；(c)指示电极的上侧具有两个辅助扩散组件；(d)指示电极的上侧和下侧具有两个辅助扩散组件。

[0050] 图6表示至少一个辅助扩散组件在参比电极两侧的多种分布方式，其中(a)表示参比电极的下侧具有一个辅助扩散组件；(b)参比电极的两侧(上侧和下侧)都具有一个辅助扩散组件；(c)参比电极的上侧具有两个辅助扩散组件；(d)参比电极的上侧和下侧具有两

个辅助扩散组件。

[0051] 图7.当给指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中的本发明反应试剂1时,利用电势法进行检测而获得的检测结果图。

[0052] 图8.当给指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中的对比反应试剂1时,利用电势法进行检测而获得的检测结果图。

[0053] 图9.当给指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中的对比反应试剂2时,利用电势法进行检测而获得的检测结果图。

[0054] 图10.当给指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中本发明反应试剂2时,利用电势法进行检测而获得的检测结果图。

[0055] 图11.当给指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中本发明反应试剂3时,利用电势法进行检测而获得的检测结果图。

[0056] 图12.当给指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中本发明反应试剂1时,利用电流法进行检测而获得的检测结果图。

[0057] 图13.指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中本发明反应试剂2时,利用电流法进行检测而获得的检测结果图。

[0058] 图14.指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中本发明反应试剂3时,利用电流法进行检测而获得的检测结果图。

具体实施方式

[0059] 当利用本发明的电势型生物传感器检测血液等样品中的尿素时,如图1、图3和图4所示,所述电势型生物传感器(也称作测试条)100为一种层状结构,具有一个加样端6和一个电连接端7,包括绝缘基底1;导电层2;反应区域形成层3;通道形成层4;上盖层5。绝缘基底1、反应区域形成层3、通道形成层4和上盖层5都是由绝缘材料制作成的。优选的绝缘材料是聚氯乙烯(PVC)、聚碳酸酯、聚砜树脂、尼龙塑料、聚氨酯、硝酸纤维素、丙酸纤维素、醋酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、聚酯纤维、聚酰亚胺、聚丙烯、聚乙烯和聚苯乙烯。该电势型生物传感器的各组成部分可以碾压在一起,或者用粘合剂粘接在一起,也可用丝网印刷的方式将反应区域形成层3、通道形成层4和上盖层5依次印在绝缘基板1上。优选地,上盖层5与通道形成层4相接触的表面涂布上一层亲水性材料,常见的亲水性材料有淀粉、多糖、纤维素类分子、聚丙烯酸、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、聚氨酯和聚酰胺等。

[0060] 导电层2设置在绝缘基板1上,通过对导电层2进行划线或刻痕形成第一导电迹线21和第二导电迹线22,或者通过丝网印刷将第一导电迹线21和第二导电迹线22印在绝缘基板1上。优先地,这种划线或刻痕可通过激光进行。当然,可根据需要在绝缘基板1上设置更多的导电迹线。导电层2可由任何导电材料制成,如碳膜、金、银、锡氧化物/金、铂、其他的贵金属或它们的氧化物。导电层2还包括位于电连接端7的至少两个能够导电的触点:第一触点25和第二触点26;位于加样端6的一个电极系统,该电极系统包括一个指示电极23和一个参比电极24,而且第二导电迹线22将指示电极23与第二触点26连接在一起,第一导电迹线21将参比电极24与第一触点25连接在一起。当然,根据实际的需要,该电极系统可包括其他的电极,如一个HCT电极,该HCT电极可与指示电极23一起检测血液样品的阻抗值,根据所检测的阻抗值计算出样品的HCT值。该电极系统也可包括一对专用的HCT电极,直接用于检测

血液样品的HCT值。该电极系统还可包括至少一个样品判断电极,用于判断加入的血液样品是否充足。

[0061] 反应区域形成层3覆盖在电极系统上,具有两个分隔开的反应孔:第一反应孔31和第二反应孔32,第一反应孔31和第二反应孔32的形状可选自矩形、椭圆形、圆形、切角矩形等几何形状。第二反应孔32暴露指示电极23的部分区域或全部区域,并且在指示电极23上形成第二反应区域34,第一反应孔31暴露参比电极24的部分区域或全部区域,并且在参比电极24上形成第一反应区域33。反应区域形成层3除了覆盖电极系统之外,还可向电连接端7延伸,从而部分或全部覆盖第一导电迹线21和第二导电迹线22,此外,还可向电连接端7继续延伸,从而部分覆盖第一触点25和第二触点26,但不能全部覆盖第一触点25和第二触点26,以确保第一触点25和第二触点26能够与用于测量指示电极23和参比电极24之间的电势差的测量仪器进行连接,从而确保指示电极23和参比电极24、第一导电迹线21和第二导电迹线22、第一触点25和第二触点26与测量仪器内部的电路形成一种开路电路,当加入血液样品时,就可以测量指示电极23和参比电极24之间的电势差。

[0062] 优选地,反应区域形成层3是通过丝网印刷方法将疏水性的绝缘材料(如绝缘性的油墨)印在绝缘基板1上形成的,与此同时在丝网印刷时,绝缘基板1的部分区域不印刷绝缘材料,从而使得在反应区域形成层3上产生两个分隔开的反应孔:第一反应孔31和第二反应孔32。这样做的益处在于在反应区域形成层3中,第一反应孔31和第二反应孔32的外面都是疏水性的绝缘材料(优选为绝缘性的油墨),这样当往第一反应区域33加入第一反应试剂和往第二反应区域34加入第二反应试剂时,第一反应试剂仅在第一反应区域33内扩散而不会扩散到第一反应区域33的外面,第二反应试剂仅在第二反应区域34内部扩散而不会扩散到第二反应区域34的外面,这样就会避免第一反应试剂溢出到第一反应区域33外面和第二反应试剂溢出到第二反应区域34外面而导致第一反应区域33和第二反应区域34中的反应试剂数量不论在同一批次的不同电势型生物传感器之间,还是在不同批次的不同电势型生物传感器之间存在差异而导致检测结果不准确。

[0063] 此外,反应区域形成层3也可选为双面胶带或者单面胶带,从而将反应区域形成层3粘在绝缘基板1上。此外,反应区域形成层3也可由塑料片材支撑,然后在它的一边包被上压敏型粘合剂或者光敏聚合物,其中在超声波的作用下,光敏聚合物结合到绝缘基板1上。

[0064] 指示电极23上的第二反应区域34含有第二反应试剂。参比电极24上的第一反应区域33含有第一反应试剂。第二反应试剂和第一反应试剂可通过点液或丝网印刷等方法分别添加到第二反应孔32和第一反应孔31上。

[0065] 通道形成层4设置在反应区域形成层3上,覆盖着指示电极23上的第二反应区域34和参比电极24上的第一反应区域33。通道形成层4具有一个位于加样端6的开口41,开口41位于指示电极23上的第二反应区域34和参比电极24上的第一反应区域33的上方,因而让指示电极23上的第二反应区域34和参比电极24上的第一反应区域33至少部分暴露出来。开口41的形状可为矩形、U形、椭圆形、圆形、切角矩形(即四个角是弧形的矩形)等,开口41直接延伸到加样端6。开口41的宽度优选为1.0~2.5mm,指示电极23上的第二反应区域34和参比电极24上的第一反应区域33的宽度大约为开口41宽度的2~3倍,这就确保加入的样品更多地位于聚集在第一反应区域33和第二反应区域34,而更少地停留在开口41中,这就会更快地溶解第一反应区域33上的第一反应试剂和第二反应区域34上的第二反应试剂,减少检测

时间,同时也有助降低样品用量。通道形成层4可选为双面胶带,从而将通道形成层4粘在反应区域形成层3上。此外,通道形成层4也可由塑料片材支撑,然后在它的一边包被上压敏型粘合剂或者光敏聚合物,其中在超声波的作用下,光敏聚合物结合到反应区域形成层3上。此外,也可通过丝网印刷方法将通道形成层4印在反应区域形成层3上。

[0066] 上盖层5设置在通道形成层4上,覆盖着通道形成层4的开口41。上盖层5与通道形成层4的开口41、反应区域形成层3和绝缘基板1一起形成样品通道。上盖层5含有通气孔51,通气孔51位于样品通道的上方,用于加样时排出样品通道中的空气。加样口位于电势型生物传感器100的加样端6中,而且加样口与样品通道是相通的,这意味着当将样品加入加样口时,在毛细管作用下,样品通过加样口进入样品通道,溶解参比电极24上的第一反应试剂和指示电极23上的第二反应试剂。

[0067] 通过将位于电连接端7的第一触点25和第二触点26插入到一种检测仪器的电连接器中,让电势型生物传感器100和这种检测仪器进行电连接,然后加入血液样品,让血液样品与参比电极24上的第一反应试剂和指示电极23上的第二反应试剂发生化学反应,从而导致指示电极23和参比电极24之间产生电势差,这样通过这种检测仪器就可检测出所产生的电势差。这种电势差与样品中的尿素浓度成线性关系。根据事先确定好的标准曲线,就能够很快地计算出样品中的尿素浓度。同时,鉴于在本发明中,发明人发现与现有技术中不同的是,血液等样品中的尿素浓度直接与检测到的电势差成线性关系,这就并不需要计算尿素浓度的对数值这个中间步骤,从而使得利用这种电势差检测样品中的尿素浓度无需经过复杂的计算转换,就可获得尿素测量值。

[0068] 指示电极23上的第二反应试剂包括脲酶,但不包括电子传递体,此外,优选地还至少包括聚合物粘合剂(polymer binder)、表面活性剂和缓冲剂。参比电极24上的第一反应试剂包括电子传递体但不包括脲酶,此外,优选地还至少包括聚合物粘合剂(polymer binder)、表面活性剂和缓冲剂。

[0069] 如图2所示,导电层2还包括多个辅助扩散组件27,具体而言就是在指示电极23的两侧放置至少一个辅助扩散组件27,在参比电极24的两侧放置至少一个辅助扩散组件27。这些辅助扩散组件27是由导电的碳油墨制造出来的多孔材料,其作用在于当将第二反应试剂溶液添加到指示电极23上的第二反应区域34和将第一反应试剂溶液添加到参比电极24上的第一反应区域33上时,促进这些反应试剂溶液在这些反应区域上快速而又均匀地扩散。当然,也可根据需要仅在指示电极23和/或参比电极24的一侧放置至少一个辅助扩散组件27。不论是在指示电极23的两侧都设置至少一个(比如1个、2个、3个或以上,优选为1个或2个)辅助扩散组件27还是仅在指示电极23的一侧设置至少一个(比如1个、2个、3个或以上,优选为1个或2个)辅助扩散组件27,每个辅助扩散组件27的至少一部分覆盖着指示电极23上的第二反应区域34。如图5(a)、5(c)所示,当仅在指示电极23的一侧设置至少一个辅助扩散组件27时,与指示电极23距离最近的一个辅助扩散组件27(图5(a)、5(c)中白色箭头指出的辅助扩散组件)与指示电极23之间的间隔距离为0.1~0.5mm,优选为0.25~0.4mm。如图5(b)、5(d)所示,当在指示电极23的两个相对侧边(如上侧和下侧)都含设置至少一个辅助扩散组件27时,与指示电极23的上侧距离最近的一个辅助扩散组件27(如图5(b)、5(d)中指向右侧的白色箭头指出的辅助扩散组件)和与指示电极23的下侧距离最近的一个辅助扩散组件27(如图5(b)、5(d)中指向左侧的白色箭头指出的辅助扩散组件)与指示电极23之间的间

隔距离均为0.1~0.5mm,优选为0.25~0.4mm。设置这样的间隔距离可确保第二反应试剂溶液在第二反应区域34上更加快速和更加均匀地扩散。

[0070] 同样地,不论是在参比电极24的两侧都设置至少一个(比如1个、2个、3个或以上,优选为1个或2个)辅助扩散组件27,还是仅在参比电极24的一侧设置至少一个(比如一个、两个、三个或以上,优选为1个或2个)辅助扩散组件27,每个辅助扩散组件27的至少一部分覆盖着参比电极24上的第一反应区域33。如图6(a)、6(c)所示,当仅在参比电极24的一侧设置至少一个辅助扩散组件27时,与参比电极24距离最近的一个辅助扩散组件27(图6(a)、6(c)中白色箭头指出的辅助扩散组件)与参比电极24之间的间隔距离为0.1~0.5mm,优选为0.25~0.4mm。如图6(b)、6(d)所示,当在参比电极24的两个相对侧边(如上侧和下侧)都设置至少一个辅助扩散组件27时,无论是与参比电极24的上侧距离最近的一个辅助扩散组件27(如图6(b)、6(d)中指向右侧的白色箭头指出的辅助扩散组件)还是与参比电极24的下侧距离最近的一个辅助扩散组件27(如图6(b)、6(d)中指向左侧的白色箭头指出的辅助扩散组件)与参比电极24之间的间隔距离均为0.1~0.5mm,优选为0.25~0.4mm。设置这样的间隔距离可确保第一反应试剂溶液在第一反应区域33上更加快速和更加均匀地扩散。

[0071] 鉴于检测的是血液等样品中的尿素浓度,脲酶在指示电极23上的第二反应试剂中的浓度为优选为2280U/mL~8712U/mL。

[0072] 在常规的电化学检测中,电子传递体的作用是当给电极系统施加电压时,它促进来自酶促反应的电子转移到电极上。然而,在本发明中,在检测时,并不给指示电极和参比电极施加电压来检测由此产生的电流,而是检测在反应过程中指示电极和参比电极之间产生的电势差,因此电子传递体发挥的作用并不是促进电子转移。本发明还发现如果在参比电极上不添加电子传递体,基本上不会检测到电势差;而且当在指示电极和参比电极上都添加电子传递体时,制作出的标准曲线斜率远小于1,有较差的电势差梯度,这会影响到检测结果的准确性。不过,电子传递体在本发明的具体作用目前仍是未知的。

[0073] 本发明所使用的电子传递体优选自铁化合物、钼化合物和钌化合物,其中铁化合物包括铁氰化钾($K_3Fe(CN)_6$)、亚铁氰化钾($K_4Fe(CN)_6$)、二茂铁及其衍生物;钼化合物包括二吡啶钼配合物及其衍生物;钌化合物可选自钌配位化合物,如具有化学结构式 $[Ru(NH_3)_5X]^{n+}$,其中X包括 NH_3 、卤族离子、CN、吡啶、烟酰胺,优选地,X选自 NH_3 或卤族离子。

[0074] 聚合物粘合剂应当具有良好的水溶性,也应当能够结合指示电极上的第二反应试剂和参比电极上的第一反应试剂中的其他化学试剂,从而让这些反应试剂保持稳定。聚合物粘合剂优选为纤维素衍生物,如甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、醋酸纤维素等,它的浓度优选为0.01~10%(W/W)。

[0075] 表面活性剂的作用在于促进加入的第一反应试剂溶液和第二反应试剂溶液分别在第一反应区域33和第二反应区域34中扩散,以及当加入样品时,分别快速地溶解第一反应区域33和第二反应区域34上的以固体形式存在的第一反应试剂和第二反应试剂。表面活性剂可选自阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂,比如PEG系列表面活性剂、Tween系列表面活性剂(Tween-20、Tween-21、Tween-40、Tween-60、Tween-61、Tween-80、Tween-81、Tween-85)、胆酸钠、CHAP、Triton X-100和十六烷基胆碱等。使用的表面活性剂的浓度通常为0.01%~5%(W/W)。

[0076] 缓冲剂也可能包含在第一反应试剂和第二反应试剂中,存在的缓冲剂应当保持足

量,使得加入样品时反应混合物的pH值保持在一个合适的范围内,从而确保脲酶的催化活性处于较高的水平。缓冲剂可选自柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液和Tris-HCl缓冲液等,pH 6.0~7.5。在本发明中,所使用的PBS缓冲液的浓度为0.01~0.5M,pH 6.0~7.5。

[0077] 稳定剂也可能被加入到第一反应试剂和第二反应试剂中,它的作用是有助于让第一反应试剂和第二反应试剂保持稳定,具有更长的储存期限。稳定剂可选自糖类或糖醇类物质(如蔗糖、岩藻糖、甘露醇、山梨糖醇、海藻糖、乳糖等)、氨基酸、蛋白(如BSA和酪蛋白等)和含羧基有机酸(如EDTA等)等,其浓度通常为0.1%~50% (w/w)。在本发明中,所使用的稳定剂为海藻糖,其浓度为0.25%~1% (w/w)。

[0078] 以下实施例进一步说明本发明。这些实施例不是用来限制本发明范围,而是提供对本发明的进一步理解。

[0079] 实施例1反应试剂配制

[0080] 配制本发明的指示电极上的第二反应试剂和参比电极上的第一反应试剂,如下所示:

[0081] 本发明反应试剂:指示电极上的第二反应试剂含有0.05~0.5M PBS (pH 6.0~7.5),海藻糖0.25%~1% (w/w),Triton X-100 0.1%~0.6% (v/v),脲酶(2280~8712U/mL);参比电极上的第一反应试剂含有0.05~0.5M PBS (pH 6.0~7.5),Triton X-100 0.1%~0.6% (v/v),海藻糖0.25%~1% (w/w),钐化合物、铁氰化钾 $K_3[Fe(CN)_6]$ 或亚铁氰化钾 $K_4[Fe(CN)_6]$ 1.0~4.5% (w/w)。

[0082] 本发明反应试剂1:指示电极上的第二反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),海藻糖1%,Triton X-100 1%,脲酶(4491.2U/ml);参比电极上的第一反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),Triton X-100 1%,海藻糖1%,钐化合物(2.2%)。

[0083] 本发明反应试剂2:指示电极上的第二反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),海藻糖,Triton X-100,脲酶(4491.2U/ml);参比电极上的第一反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),Triton X-100 1%,海藻糖1%,铁氰化钾 $K_3[Fe(CN)_6]$ (2.2%)。

[0084] 本发明反应试剂3:指示电极上的第二反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),海藻糖,Triton X-100,脲酶(4491.2U/ml);参比电极上的第一反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),Triton X-100 1%,海藻糖1%,亚铁氰化钾 $K_4[Fe(CN)_6]$ (2.2%)。

[0085] 对比反应试剂1:

[0086] 指示电极上的第二反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),海藻糖1%,Triton X-100 1%,脲酶(4491.2U/ml);参比电极上的第一反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),Triton X-100 1%,海藻糖1%。

[0087] 对比反应试剂2:

[0088] 指示电极上的第二反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),海藻糖1%,Triton X-100 1%,脲酶(4491.2U/ml),钐化合物(2.2%);参比电极上的第一反应试剂含有0.1M PBS (pH 7.2),Triton X-100 1%,海藻糖1%,钐化合物(2.2%)。

[0089] 实施例2:检测电势差

[0090] 利用如图1或图2所述的电势型生物传感器(这里以图2中的电势型生物传感器为例进行说明)检测血液样品,血液样品可选自血浆、血清或全血,这里以全血样品为例进行说明,详细步骤如下所示:

[0091] (1) 将所述电势型生物传感器的电连接端通过所述电势型生物传感器的第一触点和第二触点插入到一种检测仪器(所述检测仪器有很多类型,这里以为电化学工作站 Biologic VSP EC-Lab为例进行说明)的电连接器中;

[0092] (2) 选择多种不同尿素浓度(这里以4.5mM、14.5mM、24.5mM和41.5mM四种不同的浓度进行说明)的全血样品,在不给指示电极和参比电极施加外部电压的情形下,将全血样品加入到电势型生物传感器的加样口中,并让全血样品与第一反应试剂和第二反应试剂发生化学反应;

[0093] (3) 采用开路电势法检测电势型生物传感器中的指示电极和参比电极之间的电势差;

[0094] (4) 每种不同尿素浓度的全血样品平行检测多次(一般在3~5次),然后计算多次测量的电势差平均值。鉴于血液等样品中的尿素浓度与检测到的电势差成线性关系,可获得两者之间的线性方程式。

[0095] 当指示电极上的第二反应试剂和参比电极上的第一反应试剂选自实施例1中的本发明反应试剂1时,检测结果如表1和图7所示,所获得的线性方程式为 $y=1.0032x+12.745$ ($R^2=0.9985$)。由表1和图7可知,当仅参比电极的反应区域添加电子传递体钌化合物时, $R^2 \geq 0.98$,4次平行测量的 $CV < 7.5\%$,而且针对不同尿素浓度的全血样品测出的电势差具有良好的梯度(线性方程的斜率大于1),而且多次平行测量的电势差值相对偏差较小,测量比较准确。

[0096] 表1

红细胞压积 (HCT)	42%			
尿素浓度(mM)	4.5	14.5	24.5	41.5
检测结果	电势差 ΔE (mV)			
Rep.1	17.8	28.5	36.6	54.2
Rep.2	17.2	29.1	37.2	51.1
Rep.3	16.5	26.6	35.8	56.8
Rep.4	15.3	28.4	39.1	54.8
平均值	16.70	28.15	37.18	54.23
SD	1.07	1.08	1.41	2.36
CV	6.4%	3.8%	3.8%	4.4%

[0098] 与此同时,当指示电极上的第二反应试剂和参比电极上的第一反应试剂选自实施例1中的对比反应试剂1时,检测结果如表2和图8所示。由表2和图8可知,当指示电极上的反应区域和参比电极上的反应区域都不添加电子传递体钌化合物时, $R^2 \geq 0.98$,4次平行测量的 CV 均大于10%,特别是尿素浓度为4.5mM时, CV 高达34.5%,因此多次平行测量的电势差值相对偏差比较大,测量不准确,此外针对不同的尿素浓度测量出的电势差值比较小,没有良好的梯度(线性方程的斜率为0.0228,小于0.3),彼此之间无法有效地区分开来。最后,相比于表1和表3,表2中在不同尿素浓度下测出的电势差值显著偏小,可以忽略不计,再考虑到背景信号的影响,基本上没有检测到有效的电信号。

[0099] 表2

[0100]

红细胞压积 (HCT)	42%		
尿素浓度(mM)	4.5	14.5	41.5
检测结果	电势差 ΔE (mV)		
Rep.1	0.9	1.0	2.2
Rep.2	1.7	1.4	2.1
Rep.3	0.9	1.5	1.7
Rep.4	0.9	1.2	1.7
平均值	1.10	1.30	1.93
SD	0.38	0.23	0.25
CV	34.5%	17.7%	13.0%

[0101] 此外,当指示电极上的第二反应试剂和参比电极上的第一反应试剂选自实施例1中的对比反应试剂2时,检测结果如表3和图9所示。由表3和图9可知,当指示电极的反应区域和参比电极的反应区域都添加电子传递体钌化合物时, $R^2 < 0.98$,4次平行测量的 $CV < 7.5\%$,但是针对不同尿素浓度的样品测出的电势差具有较差的梯度(线性方程的斜率为0.3029),不能有效地区分不同浓度的样品(尤其是低浓度的样品),因而在检测低浓度样品时容易产生测量误差。

[0102] 表3

[0103]

红细胞压积 (HCT)	42%			
尿素浓度(mM)	4.5	14.5	24.5	41.5
检测结果	电势差 ΔE (mV)			
Rep.1	9.9	13.0	18.0	20.0
Rep.2	10.0	13.2	17.4	21.7
Rep.3	9.0	14.6	16.9	20.8
Rep.4	10.1	12.9	17.3	21.1
平均值	9.74	13.41	17.38	20.90
SD	0.52	0.80	0.44	0.69
CV	5.3%	6.0%	2.5%	3.3%

[0104] 实施例3:选择电子传递体

[0105] 让本发明反应试剂1中的电子传递体分别更换为铁氰化钾或亚铁氰化钾,当更换为铁氰化钾时,指示电极上的第二反应试剂和参比电极上的第一反应试剂如实施例1中的本发明反应试剂2所示;当更换为亚铁氰化钾时,指示电极上的第二反应试剂和参比电极上的第一反应试剂如实施例1中的本发明反应试剂3所示。

[0106] 选择四种不同尿素浓度(5.4mM、17.5mM、25.4mM和31.8mM)的全血样品,按照实施例2中的电势差检测方法检测,每种不同尿素浓度的全血样品平行检测多次(一般在3~5次),然后计算多次测量的电势差平均值。鉴于血液等样品中的尿素浓度与检测到的电势差成线性关系,可获得两者之间的线性方程式。

[0107] 当指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中的本发明反应试剂2时,检测结果如表4和图10所示。由表4和图10可知,相比于不添加电子传递体时,电极系统产生了明显的电信号,这从测量出的平均电势差值 $>65\text{mV}$ 就可得知,此外 $R^2 > 0.98$,但是当尿素浓度分别

为17.5mM、25.4mM和31.8mM时,5次平行测量的CV均大于10%,最高时为17.6%,不过都小于20%。

[0108] 表4

红细胞压积 (HCT)	42%			
尿素浓度(mM)	5.4	17.5	25.4	31.8
检测结果	电势差 ΔE (mV)			
Rep.1	63.1	103.6	112.4	136.8
Rep.2	64.5	105.1	128.4	151.6
[0109] Rep.3	70.1	94.1	136.7	181.6
Rep.4	62.2	78.2	146.4	111.2
Rep.5	65.2	93.9	98.5	155.3
平均值	65.02	94.98	124.47	147.28
SD	3.06	10.75	19.15	25.85
CV	4.7%	11.3%	15.4%	17.6%

[0110] 当指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中的本发明反应试剂3时,检测结果如表5和图11所示。由表5和图11可知,相比于不添加电子传递体时,电极系统产生了明显的电信号,这从测量出的平均电势差值 $>32\text{mV}$ 就可得知,此外 $R^2>0.98$,但是当尿素浓度分别为5.4mM和17.5mM时,5次平行测量的CV均大于10%,最高时为19.7%,不过都小于20%。

[0111] 表5

红细胞压积 (HCT)	42%			
尿素浓度(mM)	5.4	17.5	25.4	31.8
检测结果	电势差 ΔE (mV)			
Rep.1	33.2	61.8	73.3	82.7
Rep.2	30.8	63.1	69.9	88.7
[0112] Rep.3	22.0	45.8	69.9	78.7
Rep.4	36.1	50.9	67.5	86.6
Rep.5	38.4	51.7	73.3	87.0
平均值	32.10	54.65	71.83	84.74
SD	6.33	7.47	4.33	4.03
CV	19.7%	13.7%	6.0%	4.8%

[0113] 实施例4:评估不同的电化学方法

[0114] 针对不同尿素浓度的全血样品,利用实施例1中的本发明反应试剂1、本发明反应试剂2和本发明反应试剂3,按照常规的电流检测法(即将本发明图1或图2的电势型生物传感器连接到一种检测装置,具体为电化学工作站Biologic VSP EC-Lab,该检测装置给指示电极和参比电极之间施加0.4V电压,加入样品后,指示电极上的第二反应区域和参比电极上的第一反应区域产生酶促反应并产生电子,检测由此产生的电流,最后由测量的电流值计算全血样品中的尿素浓度)进行检测,为了便于比较,同时也按照实施例2中的方法进行电势法检测。

[0115] 当指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中的本发明反应试剂1时,电流检

测法的检测结果如表6和图12所示。由表6和图12可知,针对不同尿素浓度的全血样品测出的电流值具有较差的梯度,不能有效地区分不同浓度的全血样品,因而容易产生测量误差。

[0116] 表6

红细胞压积 (HCT)	42%			
尿素浓度(mM)	4.5	14.5	24.5	41.5
检测结果	电流 (μA)			
Rep.1	2.50	2.63	2.64	2.69
Rep.2	2.78	2.87	2.35	2.40
Rep.3	2.43	2.54	2.68	2.56
平均值	2.57	2.68	2.56	2.55
SD	0.19	0.17	0.18	0.15
CV	7.4%	6.3%	7.0%	5.9%

[0117] 当指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中的本发明反应试剂2时,电流检测法的检测结果如表7和图13所示。由表7和图13可知,针对不同尿素浓度的样品测出的电流值具有较差的梯度,不能有效地区分不同浓度的样品,因而容易产生测量误差。

[0119] 表7

红细胞压积 (HCT)	42%			
尿素浓度(mM)	4.5	14.5	24.5	41.5
检测结果	电流 (μA)			
Rep.1	0.13	0.00	0.21	0.20
Rep.2	0.13	0.16	0.16	0.20
Rep.3	0.17	0.14	0.17	0.19
平均值	0.14	0.10	0.18	0.20
SD	0.02	0.09	0.03	0.0047
CV	14.3%	90.0%	16.7%	2.4%

[0120] 当指示电极和参比电极的反应区域添加实施例1中的本发明反应试剂3时,电流检测法的检测结果如表8和图14所示。由表8和图14可知,针对不同尿素浓度的全血样品测出的电流值具有较差的梯度,不能有效地区分不同尿素浓度的全血样品,因而容易产生测量误差。

[0122] 表8

红细胞压积 (HCT)	42%			
尿素浓度(mM)	4.5	14.5	24.5	41.5
检测结果	电流 (μA)			
Rep.1	0.59	0.87	0.85	0.92
Rep.2	0.54	0.90	0.86	0.92
Rep.3	0.56	0.82	0.89	0.92
平均值	0.57	0.86	0.87	0.92
SD	0.03	0.04	0.02	0.00
CV	5.3%	4.7%	2.3%	0

[0124] 实施例5:评估红细胞压积(HCT)的影响

[0125] 对样品中的葡萄糖等组分进行电化学检测中,红细胞压积会影响检测结果。为此,本发明评估了不同的红细胞压积对电势法检测结果的影响。选择低尿素浓度(4.5mM)的全血样品和高尿素浓度(43.5mM)的全血样品,检测不同红细胞压积下的电势差,检测结果如表9所示。

[0126] 表9

红细胞压积(HCT)	30%	42%	60%	30%	42%	60%
尿素浓度(mM)	4.5			43.5		
检测结果	电势差 ΔE (mV)					
Rep.1	33.9	39.5	35.7	91.6	86.6	80.0
Rep.2	40.5	37.1	36.4	90.9	85.1	78.2
Rep.3	39.6	35.1	36.6	90.0	86.4	81.4
Rep.4	38.4	35.3	37.0	95.0	83.8	76.4
平均值	38.09	36.77	36.41	91.88	85.49	79.02
SD	2.93	2.02	0.56	2.20	1.30	2.14
CV	7.7%	5.5%	1.5%	2.4%	1.5%	2.7%
偏差(平均值-对照值)	1.3	---	-0.4	6.4	---	-6.5
偏差/对照值	3.5%	---	-1.1%	7.5%	---	-7.6%

[0127] 其中,以HCT为42%检测到的电势差平均值作为对照值(control),可知当HCT=30%时和当HCT=60%时检测到的电势差平均值与HCT=42%时检测到的电势差平均值相差幅度都在10%以内。可知,HCT对检测结果的干扰比较小。

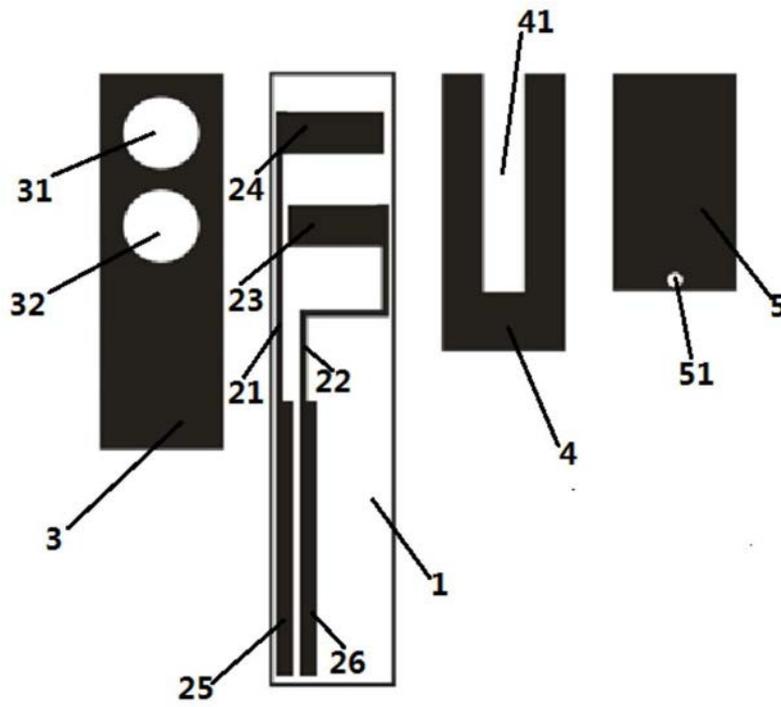


图1

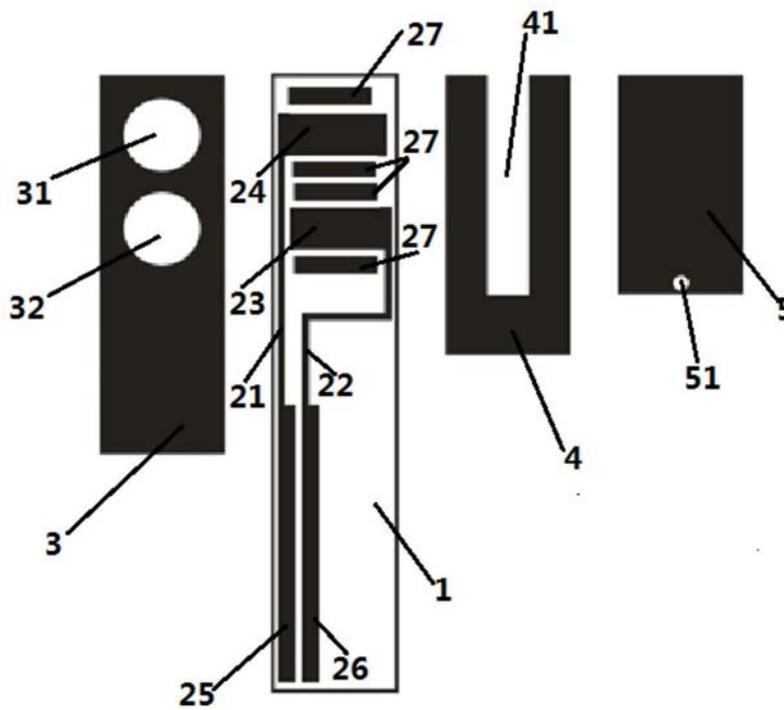


图2

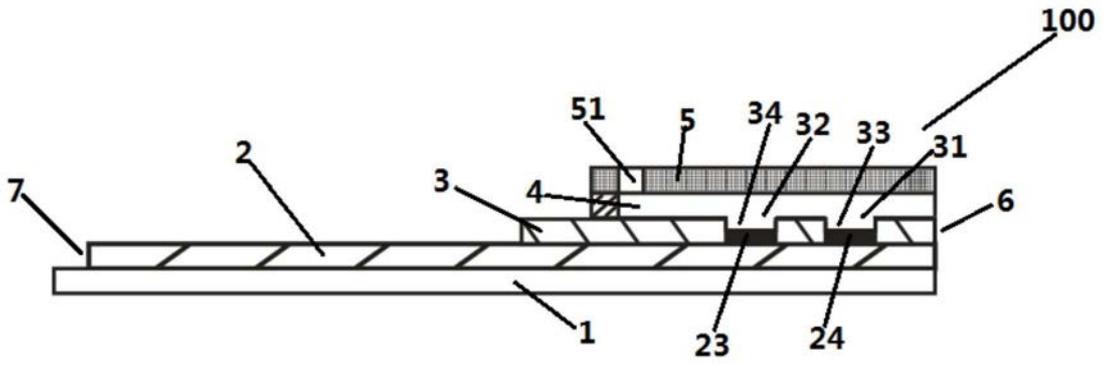


图3

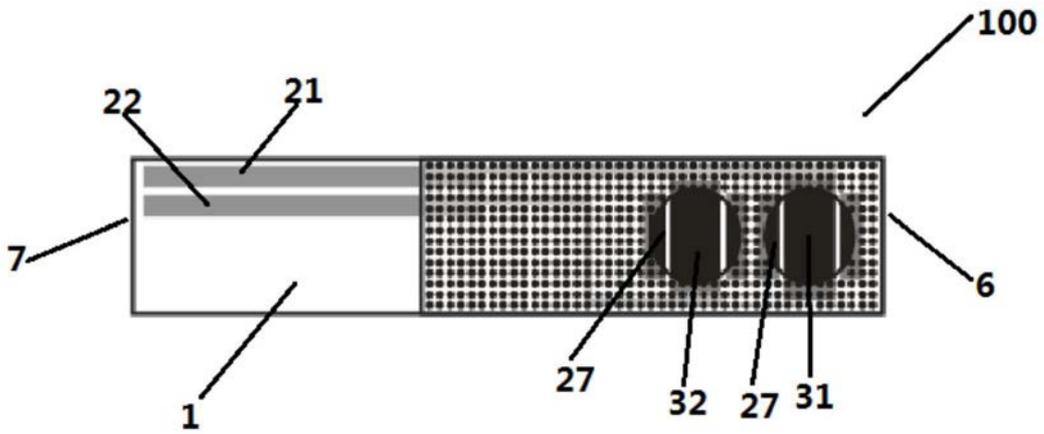


图4

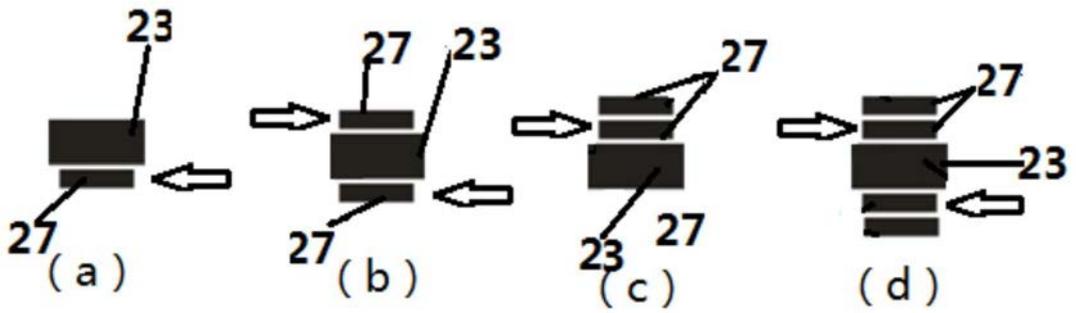


图5

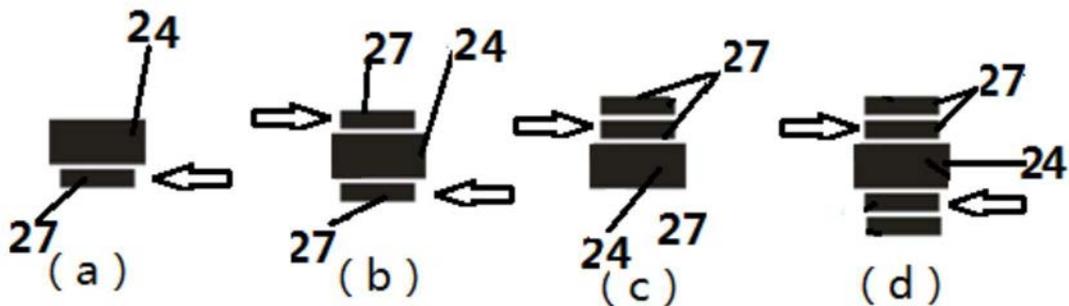


图6

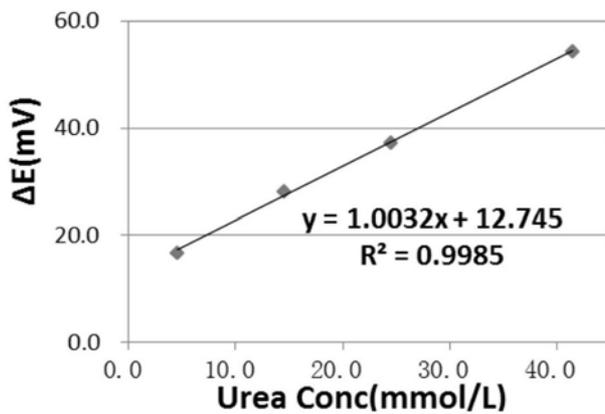


图7

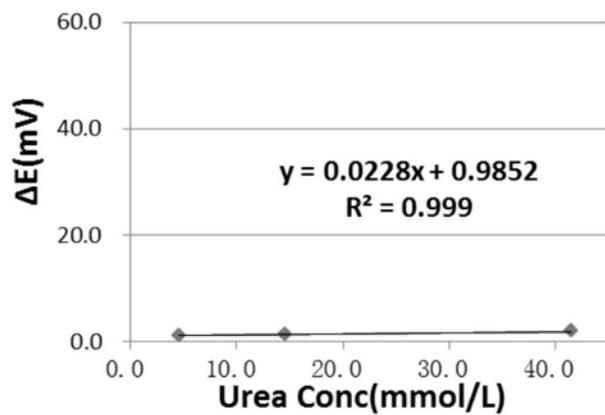


图8

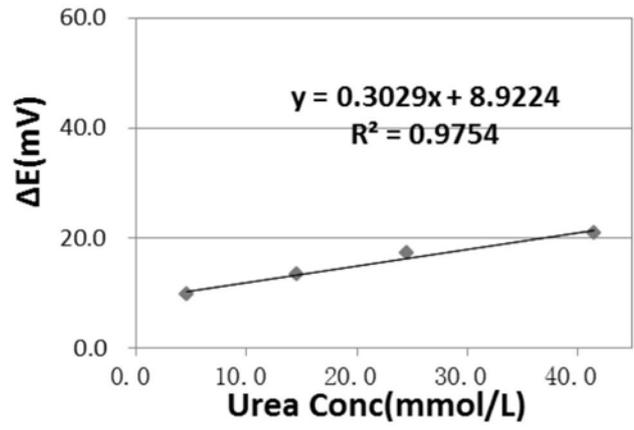


图9

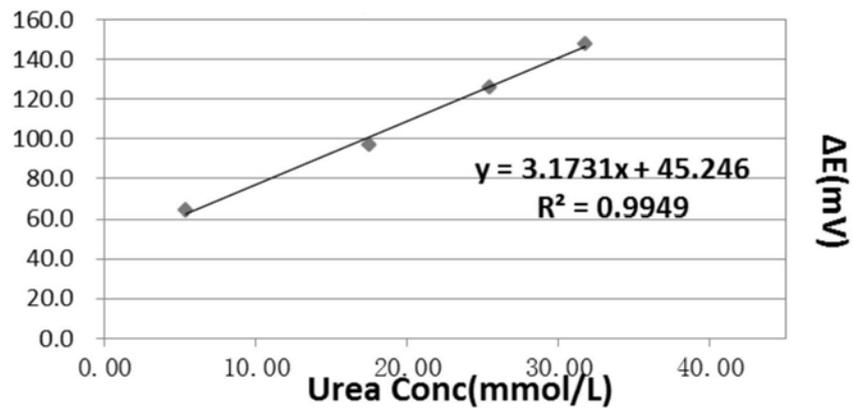


图10

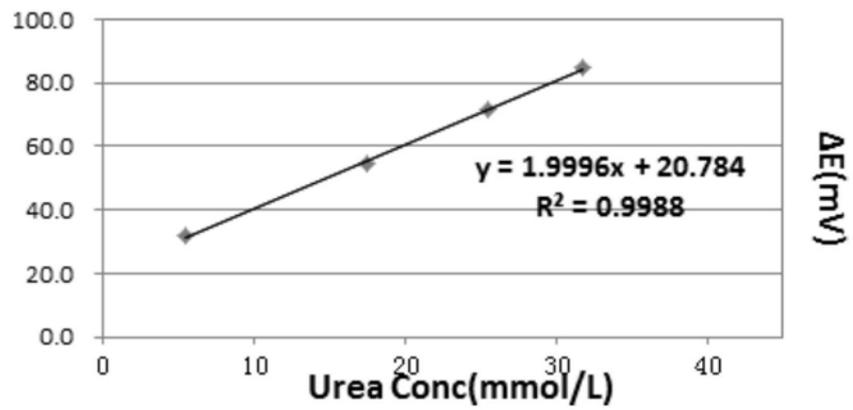


图11

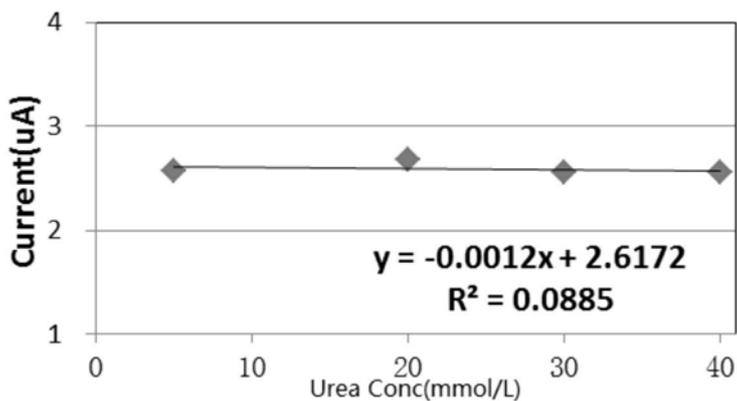


图12

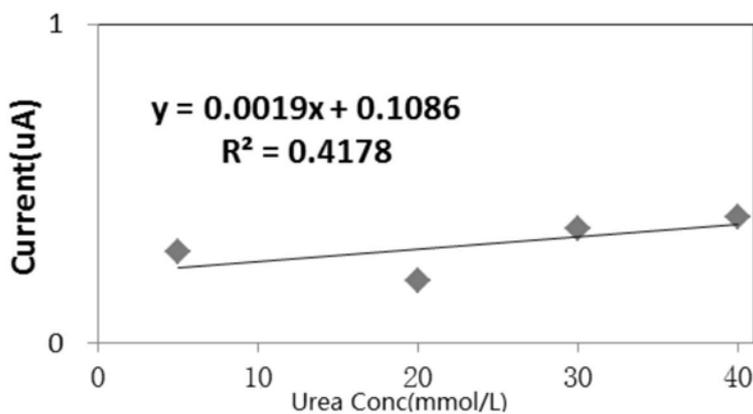


图13

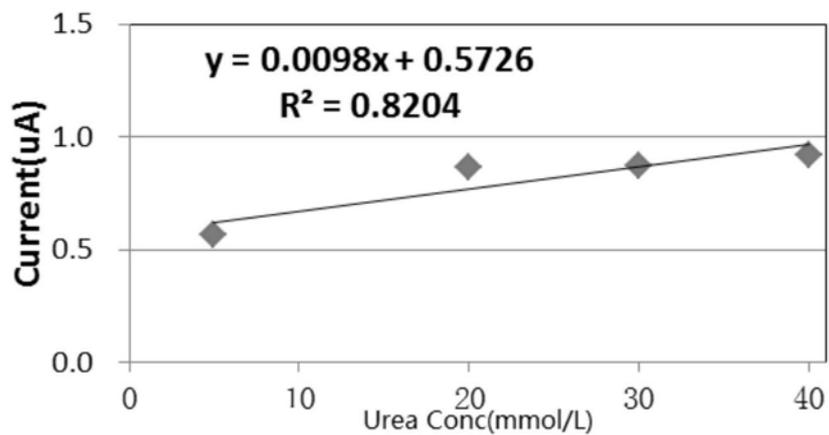


图14