

發明專利說明書

中文說明書替換頁(98年2月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：096124501

※ 申請日期：96.7.5

※ IPC 分類：G01N 33/53 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

複合修飾電極試片

COMPOSITE MODIFIED ELECTRODE TRIP

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 五鼎生物技術股份有限公司

APEX BIOTECHNOLOGY CORPORATION

2. 國立交通大學

NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

1. 沈燕士

SHEN, THOMAS Y.S.

2. 吳重雨

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 新竹市科學工業園區力行五路7號

No 7, LI-HSIN ROAD V, HSINCHU SCIENCE BASED,

INDUSTRIAL PARK HSINCHU TAIWAN, R.O.C.

2. 新竹市大學路1001號

國籍：(中文/英文)

1. 中華民國 R.O.C.

2. 中華民國 R.O.C.

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 陳思豪

CHEN, SZ-HAU

2. 林志生

LIN, CHIH-SHENG

3. 陳冠廷

CHEN, GUAN-TIN

4. 林岳暉

LIN, YUEH-HUI

5. 沈燕士

SHEN, THOMAS Y.S.

國 籍：(中文/英文)

1. 中華民國 R.O.C.

2. 中華民國 R.O.C.

3. 中華民國 R.O.C.

4. 中華民國 R.O.C.

5. 中華民國 R.O.C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 本案在向中華民國提出申請前未曾向其他國家提出申請專利。

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種用於測量電化學訊號之具表面修飾之電極試片，其經由奈米尺寸金粒子層與脂溶性電子媒介物層，協同放大電子訊號。本發明另關於含有該電極試片之生物感測器。

六、英文發明摘要：

The subject invention provides a surface-modified electrode trip for measuring electrochemical signal, wherein the electrochemical signal is synergistically amplified by means of a nano-scaled gold particle layer and a lipid-soluble electron mediator layer. A biosensor comprising the electrode trip is also provided.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(2)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

- 5 電化學反應端
- 7 奈米尺寸之金粒子層
- 8 架橋劑
- 9 脂溶性之電子媒介物層

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於利用奈米尺寸金粒子層與脂溶性電子媒介物層以協同放大用於測量電化學訊號之電極試片的電子訊號，及含其之生物感測器。

【先前技術】

生物感測分析技術被譽為二十一世紀科技之新寵，生物感測器則係應用生物感測分析技術構成之檢測分析系統，係由生物識別性材料與各種訊號轉換器組合而成。電化學生物感測器系統簡易的特性，同時具有優異的靈敏度，因此成為一個絕佳的感測元件傳導機制，加上生物分子間的特異性(specificity)關係，更可解決感測元件經常面臨的選擇性(selectivity)問題。由於生物感測器與電極試片可提供高準確度的快速檢測，因此其可在研究及臨床上用以處理大批的檢體，其中酵素-電化學感測器，如市售之電化學血糖量測系統，即是利用電極上之葡萄糖氧化酶，進行葡萄糖分子的濃度測定。酵素固定化的生物感測器的演進可概分為三個發展階段，第一階段是利用一般溶氧感測電極，感測氧化酵素催化待測物過程中所消耗的溶氧，間接得知待測物濃度；另一種則偵測酵素催化反應中具電化學活性之產物，常見的如過氧化氫。第二階段的運用主要為電子傳遞物的加入，藉由電子傳遞物提高電子傳遞至電極表面的效率，同時亦利用其具有氧化還原可逆的特性，接收酵素催化反應所產生的電子使電子傳遞物質還原成還原

態，並於電極表面進行氧化反應以順利將電子傳遞給電極以形成電訊號，其優點為電子傳遞物具較低的氧化還原電位，可降低整個感測作用所需的電位，避免因高電位所產生之其它干擾物質所造成的影響。第三階段則是運用一些具輔助因子的酵素，則可加入輔助因子以降低酵素催化氧化或還原反應時電子自酵素傳遞出的阻力，最常見的輔助因子如菸鹼醯胺腺嘌呤雙核甘酸(nicotinamide adenine dinucleotide; NADH)，NADH可將電子藉由可逆的氧化及還原過程將電子傳遞至電極上，許多研究成果顯示此種方法之電子傳遞效率遠高於前二階段之方法，而使感測器有較高的靈敏度，但缺點則為酵素固定化的製備過程繁瑣，並且其在室溫下的安定性並不佳，不利於商品的運輸與儲放。

利用抗體與抗原或雙股互補或部份互補之核糖核酸或去氧核糖核酸，此等具有高選擇性及親和性作為生物分子檢測設計模式，研究者可將高選擇性及親和性生物分子固定於各式感測器上，作為檢測標識。該生物分子包括但不限於抗體、各式抗原、酵素、核酸、組織或個體細胞。因此，可選用抗原、抗體與電化學裝置之組合，其原理與傳統固相免疫分析法相似，但抗體或抗原係固定在感測器之表面，藉由固定相分子與其相對應之流動相分子結合，用來偵測抗體與抗原間之交互作用，並以感測器中之轉換器擴大可偵測之電訊號來進行定量分析，此裝置稱為免疫電化學感測器。

酵素標定式的免疫電化學感測係為目前最為普遍發展的方式，其中的非均相的酵素免疫分析方法包括競爭式分析與三明治式分析兩種。競爭式的主要步驟包括：(1)將對待測抗原具特異性的抗體固定於電極表面，(2)同時置入經酵素標定的抗原及待測抗原，(3)以潤洗步驟移去未結合的抗原，置入此標定酵素的受質(substrate)進行催化反應，並產生具電化學活性的產物，(4)藉由偵測此產物進而定量待測抗原，基於此感測原理，在競爭式分析中所得電流訊號和待測抗原濃度呈反比關係。相反地，三明治式的感測機制所得電流訊號則與待測抗原濃度呈正比關係。免疫電化學感測器與傳統免疫分析法比較，能夠有效降低小量多樣之分析操作成本。但免疫電化學感測器於實際應用時，經常因檢測標的物濃度過低，造成後續電流之訊號/雜訊比過低之問題。因此，在發展免疫電化學量測系統時，需要發展一種具有放大氧化還原電流訊號之生物感測電極試片，其具有經強化之電訊號因而提升偵測準確度之方法。

再者，一般免疫分析方法可檢測生物或生物分子種類之範圍很廣，例如常引起食物中毒事件的大腸桿菌與腸炎弧菌常為新穎的免疫分析方法之研究對象。食物中所含有的病原菌很多，傳統上需要以不同的增菌性及選擇性培養基進行分離，然後再進一步以生化反應測試才能將菌種準確的鑑定出來。這也是現今傳統檢測方法往往需要較多的時間及人力之緣故，而且經常於遇到新型或變種的病原菌時即束手無策，此亦是迫切須要解決的問題。

美國專利第6,491,803號與中國大陸專利申請公開案第1462880A號及第1462881A號即為奈米尺寸材質於生化感測電極之相關應用。然而，該等專利仍不脫先前技術，其仍需要繁複之製備過程。美國專利第6,491,803 B1號係揭示一種試片，惟該試片之製備時需先行混合所有反應物質(包含奈米金屬粒子)，隨後藉由網印以塗佈於電極，然其網印條件要相當嚴苛才能維持網印的均一性。中國大陸專利申請公開案第1462880A號及第1462881A號則需依序塗佈並乾燥羧甲基纖維素等水溶性高分子載體、修飾過之奈米碳管及酵素反應層(包含酵素、電子媒介物、穩定劑、緩衝液等)等至少三層物質之加工，電極試片製作過程甚為繁複。中華民國第I276799號發明專利則為奈米碳管於生化感測電極之一種簡化加工之應用。

但即便綜合前述技藝，包括電子媒介物的使用、親和性生物分子辨識程序、奈米材質於電化學量測之使用，並無法輕易推知、或可直接實施於免疫辨識過程中反覆的浸泡、清洗程序，也無法同時解決低含量免疫檢測標的物所伴隨而來的低訊雜比問題；因此，對此業界而言，仍存有不需如先前技藝般繁瑣之加工步驟且同時仍能保留足夠大之電流訊號之電極試片之需求。本發明即是為解決此一極具應用性之課題。

【發明內容】

本發明之一目的在於提供一種具表面修飾，以增加氧化還原電子訊號之用於測量電化學訊號之電極試片，其包

含：

一 平板絕緣基材；

一 具導電膜之電極系統，其中該導電膜係塗覆在該平板絕緣基材之一面，以形成分離且不相連接之一工作電極與一參考電極；

一 塗佈於該平板絕緣基材上之電絕緣層，其係部分覆蓋該電極系統，使該電極系統未被該電絕緣層覆蓋之部分分別形成包含工作電極及參考電極之接線端及電化學反應端；

一 具奈米尺寸金粒子層，其係至少部分覆蓋該工作電極之該電化學反應端；以及

一 脂溶性電子媒介物層，其係至少部分覆蓋該工作電極之該電化學反應端。

本發明之另一目的在提供一種生物感測器，其包含本發明的電極試片。

【實施方式】

本發明係關於一種電極試片及包含其之生物感測器，其特徵在於量測該氧化還原酵素(13)所轉移出之電子訊號時，該奈米尺寸金粒子層(7)與脂溶性電子媒介物層(9)會協同放大該電化學量測系統之電子訊號。不同以往先前技藝的繁瑣加工步驟，本發明電極試片之電化學反應區僅需二層物質之加工程序，故可降低製作成本，且同時放大電流訊號。

本發明之一目的在於提供一種具表面修飾，以增加氧化

還原電子訊號之用於測量電化學訊號之電極試片，其包含：

一平板絕緣基材(1)；

一具導電膜之電極系統(2)，其中該導電膜係塗覆在該平板絕緣基材(1)之一面，以形成分離且不相連接之一工作電極(2a)與一參考電極(2b)；

一塗佈於該平板絕緣基材上之電絕緣層(3)，其係部分覆蓋該電極系統(2)，使該電極系統(2)未被該電絕緣層覆蓋之部分分別形成包含工作電極(2a)及參考電極(2b)之接線端(4)及電化學反應端(5)；

一具奈米尺寸金粒子層(7)，其係至少部分覆蓋該工作電極(2a)之該電化學反應端(5)；以及

一脂溶性電子媒介物層(9)，其係至少部分覆蓋該工作電極(2a)之該電化學反應端(5)。

根據本發明，該平板絕緣基材(1)具有平直表面及電絕緣的特性，以及可耐40至200°C的耐熱能力以便於加溫處理。適合作為本發明之平板絕緣基材之材料包括，但不限於聚氯乙烯、玻璃纖維、聚酯、酚醛樹脂板、聚對苯二甲酸乙二酯、聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯、聚醯胺、聚苯乙烯、玻璃或陶瓷。

根據本發明，該導電膜之電極系統較佳係以網板印刷金屬膜(即網板電極，如美國專利第6,923,894 B2號所揭示)或黏附金屬膜(如美國專利第6,254,736 B1號所揭示)之方式，塗覆於該平板絕緣基材(1)之一面。適合之金屬膜材料

包括，但不限於金、銀、鉑或鈮，而適合網板印刷之印刷墨包括但不限於，碳墨、金墨、銀墨、碳墨與銀墨的混合物、揮發性石墨、銅墨或以上的組合，如先印銀墨再印碳墨。根據本發明之一具體實施態樣中，其中該網板電極包括一銀墨層及一碳墨層，且該碳墨層覆蓋於該銀墨層上。

根據本發明，該電極系統中之該工作電極之面積一般係大於參考電極之面積。

根據本發明，該至少一個電絕緣層(3)厚度為約0.01至0.6 mm。本領域習知之電絕緣材料均適用於本發明之電絕緣層，該電絕緣材料係以網印方法塗佈於該電極系統(2)上。於本發明之一具體實施態樣中，該電極系統(2)上具有兩個電絕緣層(3)，其分別橫跨該電極系統(2)之中間位置及末端，以將該電極系統(2)分隔成為電化學反應端(5)及接線端(4)。

根據本發明，該奈米尺寸金粒子層(7)係以奈米尺寸膠體金溶液塗佈於該工作電極(2a)之該電化學反應端(5)上，藉由物理性吸附而固定於該電化學反應端(5)表面上；或可預先以架橋劑(8)修飾該電化學反應端(5)表面(如圖2F及G)，以使奈米尺寸金粒子更均勻地固定於該電化學反應端(5)表面上，且該架橋劑(8)可後續鏈合其他物質(例如：蛋白質(如抗體、配體或受體)、化合物或核苷酸序列)。適用於本發明之奈米尺寸金粒子之尺寸為小於100奈米，其較佳為約5

至 50 奈米，更佳為約 13 奈米。根據本發明，適用於本發明之奈米尺寸膠體金溶液係為氯化金(HAuCl_4)經適當的催化劑，如檸檬酸鈉溶液(sodium citrate)，還原之後所得的奈米金懸浮液。

根據本發明，該脂溶性電子媒介物層(9)係藉由將脂溶性電子媒介物以有機溶劑溶解後之懸浮液塗佈於該電化學反應端(5)表面，使該脂溶性電子媒介物以物理性附著方式吸附固定於該電化學反應端(5)表面上。因此，該脂溶性電子媒介物不會因為反覆的浸泡、清洗程序而失效；同時也免去了以共價鍵結合固定於電極系統上之繁瑣程序。適用於本發明之脂溶性電子媒介物具有接收或供給電子之氧化還原特性，其包括，但不限定為四硫富瓦烯(tetrathiafulvalene)、四氰代二甲基苯醌(tetracyanoquinodimethane)、麥爾多拉藍(meldola blue)或二茂鐵(ferrocene)或其衍生物；其中較佳為二茂鐵或其衍生物(Joseph wang. 2000. Analytical electrochemistry)；更佳為 1,1'-二茂鐵二羧酸(ferrocenedicarboxylic acid)。而適用於溶解該脂溶性電子媒介物之有機溶劑包括，但不限定為酮類、醇類或二甲基亞楓(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)；其中較佳為乙醇。

根據本發明，該奈米尺寸金粒子層與該脂溶性電子媒介物層之塗覆順序並無先後限制，較佳為先塗覆該奈米尺寸金粒子層後，再塗覆該脂溶性電子媒介物層。

根據本發明，所謂「至少部分覆蓋」係指電化學反應端

(5)全被奈米尺寸金粒子層(7)及脂溶性電子媒介物層(9)所覆蓋(如圖1之6a所示)、或僅工作電極(2a)中之電化學反應端(5)完全被覆蓋(如圖一之6b所示)或部份被覆蓋(如圖一之6c所示)。

根據本發明之用於測量電化學訊號之具表面修飾之電極試片，其中尚可包括一固定於工作電極(2)之電化學反應端(5)表面，並可與標的物特異性結合之結合元件。適用於本發明之結合元件包括，但不限定為蛋白質(如抗體、抗原、蛋白質配體或受器)、核苷酸序列或化合物。技藝人士可依據標的物之結合特性(如抗體/抗原或配體/受體結合，或者核苷酸雜交)，選擇適合之結合元件，並依習知技藝(Electra Gizeli等, 2001. Biomolecular Sensors)將所選用之結合元件固定於電化學反應端(5)表面，例如以架橋劑(8)將結合元件固定於電化學反應端表面。如本發明所屬技術領域中具有通常知識者所熟知者，適用於本發明之標的物可為醫學診斷標記、藥物、細菌、毒素、環境污染物或核苷酸。

本發明之電極試片於標的物與結合元件特異性結合後，可藉由氧化還原酵素(13)與其受質(substrate)反應產生電化學活性產物，再偵測該電化學活性產物以達到定量分析受測物之目的。適用於本發明之氧化還原酵素(13)係包括，但不限定為葡萄糖氧化酶、葡萄糖還原酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶或過氧化氫酶，其中較佳係過氧化氫酶，而

其可與過氧化氫反應進行電化學量測。根據本發明，利用過氧化氫酶、過氧化氫與脂溶性電子媒介物之組合的操作電壓係為約 150 至 420 mV。根據本發明以安培-免疫感測器之電化學量測模式檢測微生物抗原之態樣中，其運用的電壓較佳為約 300 mV。

根據本發明之一較佳實施態樣(如圖五所示)，該結合元件為一第一抗體(10)，該第一抗體係以親和性與電化學反應端(5)表面結合，或藉由架橋劑(8)之共價鍵與電化學反應端(5)表面結合(如圖五(a)所示)。該第一抗體經與受測抗原(11)專一性地結合(如圖五(c)所示)後，而該受測抗原(11)再與對該抗原(11)具專一性之第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體結合(如圖五(e)所示)形成一氧化還原酵素層，再與過氧化氫反應進行電化學量測。

根據本發明之另一較佳實施態樣，該結合元件為一抗原(11)，該抗原(11)係以親和性與電化學反應端(5)表面結合，或藉由架橋劑(8)之共價鍵與電化學反應端(5)表面結合。該抗原(11)經與受測第一抗體(10)專一性地結合後，而該第一抗體(10)再與可與其結合之第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體結合形成一氧化還原酵素層，再與過氧化氫反應進行電化學量測。

根據本發明，其中之第一抗體(10)與第二抗體(12)可為單株抗體或多株抗體。且本發明不僅可用於三明治式免疫辨識結合分析(例如圖五所示)，尚可用於其他分析，例如

競爭式辨識結合分析。

根據本發明，技藝人士可依據結合元件之種類(例如蛋白質(如抗體、抗原、蛋白質配體或受器)、核苷酸序列或化合物)選擇適當之架橋劑(8)。架橋劑可以均勻且分散地形成單層或多層的排列聚合結構，根據本發明，架橋劑係具有雙官能基之化合物，其一官能基係用於與電化學反應端(5)之表面結合，另一官能基係用於與結合元件結合。適用於本發明之架橋劑係為官能基包括，但不限定為羧酸基(carboxylic acid)、硫醇基(thiol)、醇基(alcohol)、胺基(amine)或醛基(aldehyde)之化合物；其中較佳為含醛基化合物(Electra Gizeli等. 2001. Biomolecular Sensors)；而更佳為戊二醛(glutaraldehyde)。

根據本發明之較佳實施態樣，該氧化還原酵素層之形成步驟包括：

- (a) 結合第一抗體(10)或架橋劑(8)-第一抗體(10)複合體於電化學反應端(5)表面，
- (b) 洗去未結合之第一抗體(10)或架橋劑(8)-第一抗體(10)複合體，
- (c) 結合抗原(11)，
- (d) 結合第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體，及
- (e) 洗去未固結合之第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體；

或另可為：

- (a) 結合第一抗體(10)或架橋劑(8)-第一抗體(10)複合體於電化學反應端(5)表面，
- (b) 結合抗原(11)與第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體，形成抗原(11)-第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體，
- (c) 結合該第一抗體(10)與該抗原(11)-第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體，或結合該架橋劑(8)-第一抗體(10)複合體與該抗原(11)-第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體，及
- (d) 一併洗去未固結合之該抗原(11)-第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體；

或尚可為：

- (a) 結合抗原(11)或架橋劑(8)-抗原(11)複合體於電化學反應端(5)表面，
- (b) 洗去未結合之抗原(11)或架橋劑(8)-抗原(11)複合體，
- (c) 結合第一抗體(10)，
- (d) 結合第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體，及
- (e) 洗去未固結合之第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體；

亦或可為：

- (a) 結合抗原(11)或架橋劑(8)-抗原(11)複合體於電極表面於電化學反應端(5)表面，
- (b) 結合第一抗體與第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合

體，形成第一抗體(10)-第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體，

(c) 結合該抗原與該第一抗體(10)-第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體，或結合該架橋劑(8)-抗原(11)複合體與該第一抗體(10)-第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體，及

(d) 一併洗去未固結合之該第一抗體(10)-第二抗體(12)-氧化還原酵素(13)複合體。

本發明之另一目的為提供一生物感測器，其包含本文所述的電極試片及檢測裝置。較佳的是，該檢測裝置為由一電壓輸出裝置，一訊號接收裝置，以及一顯示裝置所組成之電流感測器。該電壓輸出裝置能輸出300 mV以下之電壓至根據本發明之電極試片之電化學反應區，促使反應層與檢體中特定標的物反應後而使充滿於電化學反應區之電子媒介物由還原狀態氧化成為氧化狀態。該訊號接收裝置能將此狀態改變時的電流、電壓或電阻值接收，並傳回顯示裝置，藉此顯示檢體中特定標的物的含量。

本發明之電極試片並不需要如先前技藝般繁瑣之加工步驟，同時能放大電流訊號。此外，本發明之電極試片具有可減低檢體需求量之設計，且可具有多個取樣位置(例如：將電極試片靠近檢體或將檢體滴在電極試片上)。因此，本發明之電極試片不僅製備較為簡便，可更方便而有效的自待分析物取樣，以使患者的不便可減至最低，且同

時仍能滿足保留足夠大之電子訊號的需求。

以下實施例將對本發明作進一步之說明，唯非用以限制本發明之範圍，任何於此項技術領域中具有通常知識者可輕易達成之修飾及改變，均涵蓋於本發明之保護範圍內。

[實施例]

實例 1.

根據美國專利第 6,923,894 B2 號專利之實施例一中所示之方法，將含有聚氯乙烯與聚氨酯之聚合樹脂導電碳漿，以網版印在一 PVC 板基材 (1) 之扁平表面上，以形成由各自分離之一工作電極 (2a) 與一參考電極 (2b) 所組成之電極系統 (2)，然後烘乾；隨即在印有該電極系統 (2) 之同一側，塗佈一電絕緣層，且保留部份裸露的工作電極 (2a) 與參考電極 (2b) 以形成接線端 (4) 及電化學反應端 (5)，然後烘乾，完成一作為控制組 A 之電極試片 (如圖二之 A)。

取部分控制組 A 之電極試片，並於適量的脂溶性電子媒介物 (1,1'-二茂鐵二羧酸 (ferrocenedicarboxylic acid)) 中加入少量 95% 乙醇溶液，並以超音波震盪器震盪使其完全溶解，再滴加於該控制組 A 之電極試片修飾該電化學反應端 (5)，以水去除未結合之脂溶性電子媒介物 (9) 後，完成具脂溶性電子媒介物層 (9) 之實驗組 B 電極試片 (如圖 2 之 B)。另取部分控制組 A 之電極試片，並將氯化金溶液 (HAuCl_4 , Sigma G-4022) 以油浴方式加熱，再加入檸檬酸鈉連續攪拌，以形成呈現酒紅色溶液，以備妥含有直徑約為 13 奈米之奈米膠體金顆粒溶液，滴加於該電化學反應端 (5)，以形

成一奈米尺寸金粒子層(7)，然後以水洗去未結合之金粒子層與鹽類，再進行前述脂溶性電子媒介物層(9)之塗覆程序，而完成具奈米尺寸金粒子層(7)與脂溶性電子媒介物層(9)複合修飾之電極試片，作為實驗組C(如圖二之C)。前述奈米膠體金顆粒溶液其在520 nm之較佳吸光值約為0.9至1.2。

此三種電極試片，在過氧化氫存在下，於pH 7.2磷酸緩衝溶液中進行循環伏安(cyclic voltammetry)分析，實驗組C之電流峰值約為實驗組B之4倍(如圖三)，證實該奈米尺寸金粒子層，具有放大經脂溶性電子媒介物修飾之電極的氧化還原電流之特性。

實例2.

取部分實例1控制組A之電極試片，滴加作為架橋劑(8)之戊二醛(glutaraldehyde)於電化學反應端(5)，再以水洗去未結合之架橋劑(8)，完成一作為實驗組D之電極試片(如圖二之D)。取部分實驗組D之電極試片，並如實例1所示之方法備妥以酒精溶解之脂溶性電子媒介物(1,1'-二茂鐵二羧酸)，滴加於該實驗組D之電極試片，修飾該電化學反應端(5)，以水去除未結合之脂溶性電子媒介物後，完成具脂溶性電子媒介物層(9)之實驗組E電極試片(如圖二之E)。另取部分實驗組D之電極試片，並以實例1所示之方法備妥含有直徑約在13奈米之奈米膠體金顆粒溶液，滴加於該電化學反應端，以形成一奈米尺寸金粒子層(7)，然後水洗去未結合之金粒子與鹽類，再進行前述脂溶性電子媒介物層(9)

之塗覆程序，而完成具奈米尺寸金粒子層(7)與脂溶性電子媒介物層(9)複合修飾之電極試片，作為實驗組F(如圖二之F)。進一步依據實例1的奈米膠體金顆粒溶液條件與循環伏安法，測定D、E及F組之電極試片，實驗組F之電流峰值約為實驗組E之3倍(如圖四)，證實該奈米尺寸金粒子層(7)，具有放大經脂溶性電子媒介物修飾之電極的氧化還原電流之特性。

實例3.

為將本發明之技術應用於抗原(11)之實體檢驗，先同前述實例2中實驗組F之材料與流程，製成經奈米尺寸金粒子層(7)與脂溶性電子媒介物層(9)複合修飾之電極試片。備以抗*E. coli* O157:H7之單株抗體作為第一抗體(10)，另將作為第二抗體(12)之抗*E. coli* O157:H7多株抗體與過氧化氫酶接合，形成抗*E. coli* O157:H7多株抗體-過氧化氫酶複合物。經由以下程序進行過氧化氫酶於電極上之固定(如圖五)：

- (a) 結合架橋劑(8)-第一抗體(10)複合體於電極表面，
- (b) 洗去未結合之架橋劑(8)-第一抗體(10)複合體，
- (c) 結合抗原(11)，
- (d) 結合第二抗體(12)-過氧化氫酶複合體，
- (e) 洗去未結合之第二抗體(12)-過氧化氫酶複合體。

以在pH 7.2之磷酸緩衝水溶液中之過氧化氫當作過氧化氫酶受質，採固定電壓300 mV之安培-免疫感測電化學量

測模式檢測微生物抗原。同時，另製備僅具有奈米尺寸金粒子層(7)之實驗組G電極試片(如圖二G)，以及實例2之實驗組D之電極試片，經過相同的酵素固定化程序，作為免疫感測微生物運用之比較。證實該脂溶性電子媒介物層(9)，具有再放大經奈米尺寸金粒子修飾之電極的氧化還原電流之特性(如圖六)。

因此，本發明所揭示具奈米尺寸金粒子層(7)與脂溶性電子媒介物層(9)複合修飾之電極試片，可協同性地放大氧化還原電流訊號。同時，此複合修飾電極試片即便經歷多次的浸泡與清洗，該固定於該複合修飾電極表面上之脂溶性電子媒介物亦不會因為反覆的浸泡、清洗程序而失效，同時也不須以共價鍵結合固定於電極上，因此具有減少工序、降低成本之優點。對於欲兼顧電極試片之製造成本、品質與應用之相關電化學儀器製造廠商而言，本發明所揭示之具有經奈米尺寸金粒子層(7)與脂溶性電子媒介物層(9)複合修飾之電極試片，確實可提供有效的解決方案。

【圖式簡單說明】

圖一(A)係本發明一實施例之電極試片之製備及其元件展開示意圖，圖一(B)係電化學反應端(5)及其中之電極系統被奈米尺寸金粒子層(7)及脂溶性電子媒介物層(9)所覆蓋之三種態樣。

圖二係本發明一實施例之電極修飾層示意圖，圖二A係表示該電化學反應端之截面圖，圖二B係經脂溶性電子媒介物層(9)覆蓋之電化學反應端，圖二C係經脂溶性電子媒

介物層(9)及奈米尺寸金粒子層(7)覆蓋之電化學反應端，圖二D係為表面經架橋劑結合之電化學反應端，圖二E係經脂溶性電子媒介物層(9)覆蓋及表面具架橋劑之電化學反應端，圖二F係經脂溶性電子媒介物層(9)與奈米尺寸金粒子層(7)覆蓋且表面具架橋劑之電化學反應端，及圖二G係經奈米尺寸金粒子層(7)覆蓋及表面具架橋劑之電化學反應端。

圖三係本發明實例1之循環伏安法測定結果。

圖四係本發明實例2之循環伏安法測定結果。

圖五(a)至(e)係本發明實施例3之氧化還原酵素固定流程圖。

圖六係本發明實例3之安培-免疫測定結果。

【主要元件符號說明】

- | | |
|----|------------|
| 1 | 平板絕緣基材 |
| 2 | 電極系統 |
| 2a | 工作電極 |
| 2b | 參考電極 |
| 3 | 電絕緣層 |
| 4 | 接線端 |
| 5 | 電化學反應端 |
| 6 | 電極修飾層之覆蓋態樣 |
| 6a | 完全覆蓋電化學反應端 |
| 6b | 完全覆蓋工作電極 |
| 6c | 部分覆蓋工作電極 |

- 7 奈米尺寸之金粒子層
- 8 架橋劑
- 9 脂溶性之電子媒介物層
- 10 第一抗體
- 11 抗原
- 12 第二抗體
- 13 氧化還原酵素

十、申請專利範圍：

1. 一種用於測量電化學訊號之具表面修飾之電極試片，其包含：
 - 一平板絕緣基材；
 - 一具導電膜之電極系統，其中該導電膜係塗覆在該平板絕緣基材之一面，以形成分離且不相連接之一工作電極與一參考電極；
 - 一塗佈於該平板絕緣基材上之電絕緣層，其係部分覆蓋該電極系統，使該電極系統未被該電絕緣層覆蓋之部分分別形成包含工作電極及參考電極之接線端及電化學反應端；
 - 一奈米尺寸金粒子層，其係至少部分覆蓋該工作電極之該電化學反應端；以及
 - 一脂溶性電子媒介物層，其係至少部分覆蓋該工作電極之該電化學反應端。
2. 如請求項1之電極試片，其中該奈米尺寸金粒子層之金粒子尺寸為小於100奈米。
3. 如請求項2之電極試片，其中該奈米尺寸金粒子層之金粒子尺寸為5至50奈米。
4. 如請求項3之電極試片，其中該奈米尺寸金粒子層之金粒子尺寸為13奈米。
5. 如請求項1至4中任一項之電極試片，其中該奈米尺寸金粒子層係完全覆蓋該電化學反應端。
6. 如請求項1至4中任一項之電極試片，其中該奈米尺寸金

- 粒子層係覆蓋該工作電極之該電化學反應端。
7. 如請求項1至4中任一項之電極試片，其中該奈米尺寸金粒子層係部份覆蓋該工作電極之該電化學反應端。
 8. 如請求項1至4中任一項之電極試片，其中該脂溶性電子媒介物層之脂溶性電子媒介物係選自由四硫富瓦烯(tetrathiafulvalene)、四氰代二甲基苯醌(tetracyanoquinodimethane)、麥爾多拉藍(meldola blue)或二茂鐵(ferrocene)或其衍生物所組成之群。
 9. 如請求項8之電極試片，其中該脂溶性電子媒介物層之脂溶性電子媒介物係為二茂鐵(ferrocene)或二茂鐵衍生物。
 10. 如請求項9之電極試片，其中該二茂鐵衍生物係為1,1'-二茂鐵二羧酸(ferrocenedicarboxylic acid)。
 11. 如請求項1至4中任一項之電極試片，其中該脂溶性電子媒介物層係完全覆蓋該電化學反應端。
 12. 如請求項1至4中任一項之電極試片，其中該脂溶性電子媒介物層係覆蓋該工作電極之該電化學反應端。
 13. 如請求項1至4中任一項之電極試片，其中該脂溶性電子媒介物層係部份覆蓋該工作電極之該電化學反應端。
 14. 如請求項1至4中任一項之電極試片，其中該工作電極之該電化學反應端進一步包含架橋劑。
 15. 如請求項14之電極試片，其中該架橋劑係含有雙官能基，且該官能基係選自由羧酸基(carboxylic acid)、硫醇基(thiol)、醇基(alcohol)、胺基(amine)及醛基(aldehyde)

所組成之群。

16. 如請求項15之電極試片，其中該架橋劑為含醛基之化合物。
17. 如請求項16之電極試片，其中該架橋劑為戊二醛 (glutaraldehyde)。
18. 如請求項1至4中任一項之電極試片，其中該工作電極中之該電化學反應端進一步包含一結合元件，該結合元件可與標的物特异性結合成複合物。
19. 如請求項18之電極試片，其中該結合元件係選自由蛋白質、核苷酸及化合物所組成之群。
20. 如請求項19之電極試片，其中該蛋白質係為抗體、抗原、蛋白質配體或受器。
21. 如請求項18之電極試片，其中該結合元件係以架橋劑與該工作電極中之該電化學反應端連結。
22. 如請求項18之電極試片，其中該結合元件-標的物複合物可與一氧化還原酵素形成一氧化還原酵素層。
23. 如請求項22之電極試片，其中該氧化還原酵素係為選自由葡萄糖氧化酶、葡萄糖還原酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶及過氧化氫酶所組成之群。
24. 如請求項22之電極試片，其中該氧化還原酵素層包含作為該結合元件之第一抗體、一抗原標的物、及與該抗原結合之第二抗體-氧化還原酵素複合體。
25. 如請求項22之電極試片，其中該氧化還原酵素層包含作為該結合元件之抗原、一與該抗原結合之第一抗體、及

與該第一抗體結合之第二抗體-氧化還原酵素複合體。

26. 一種生物感測器，其包含如請求項1至25中任一項之電極試片及檢測裝置。

27. 如請求項26之生物感測器，其中該檢測裝置為由一電壓輸出裝置，一訊號接收裝置，以及一顯示裝置所組成之電流感測器。

十一、圖式：

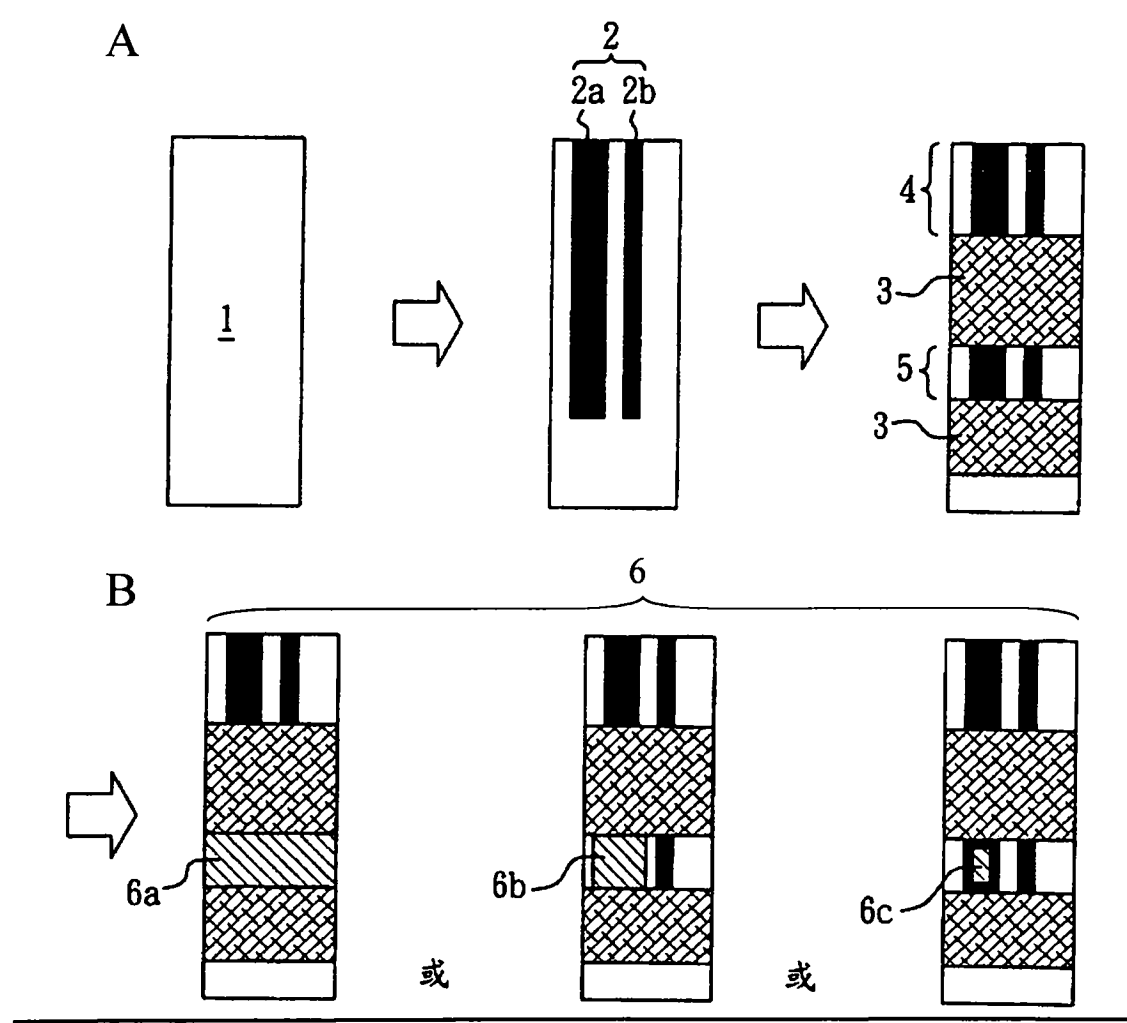


圖 1

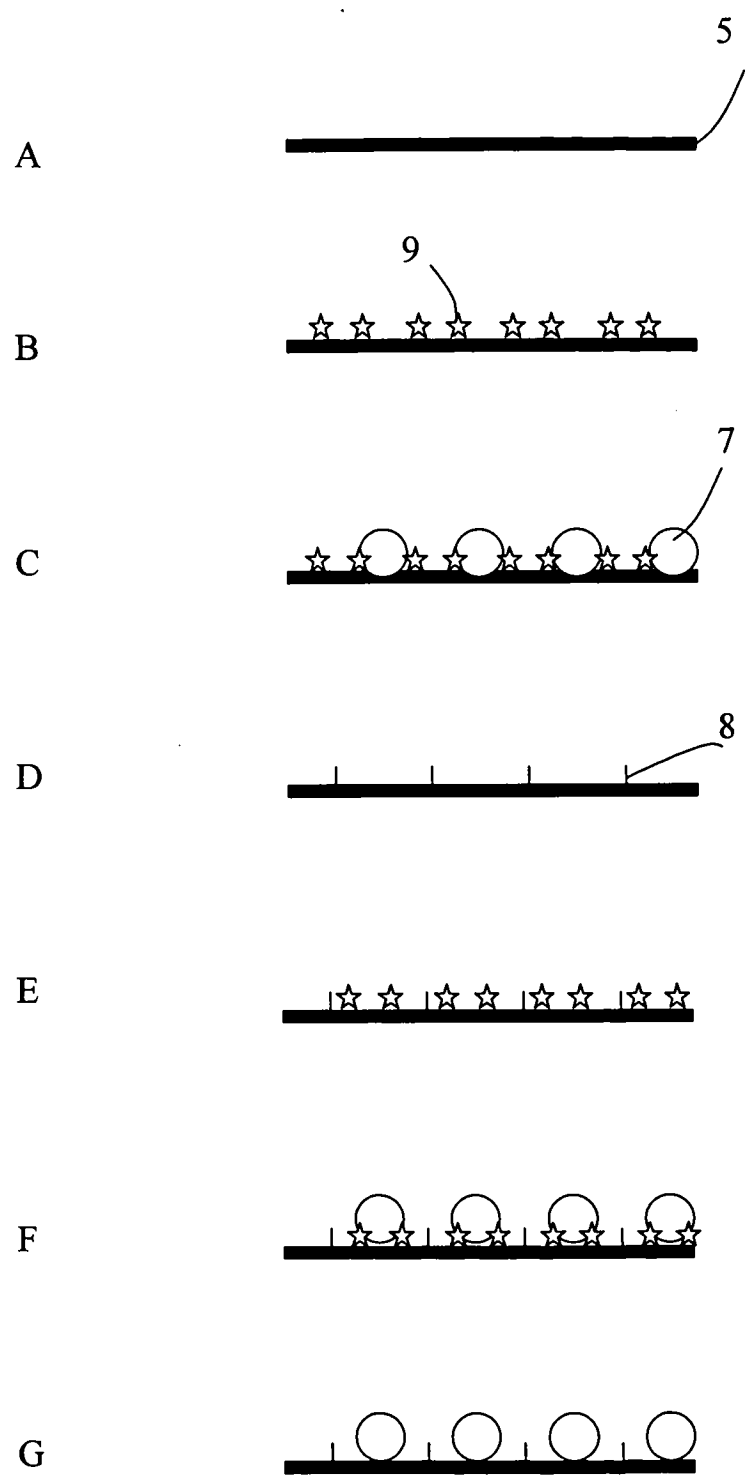


圖2

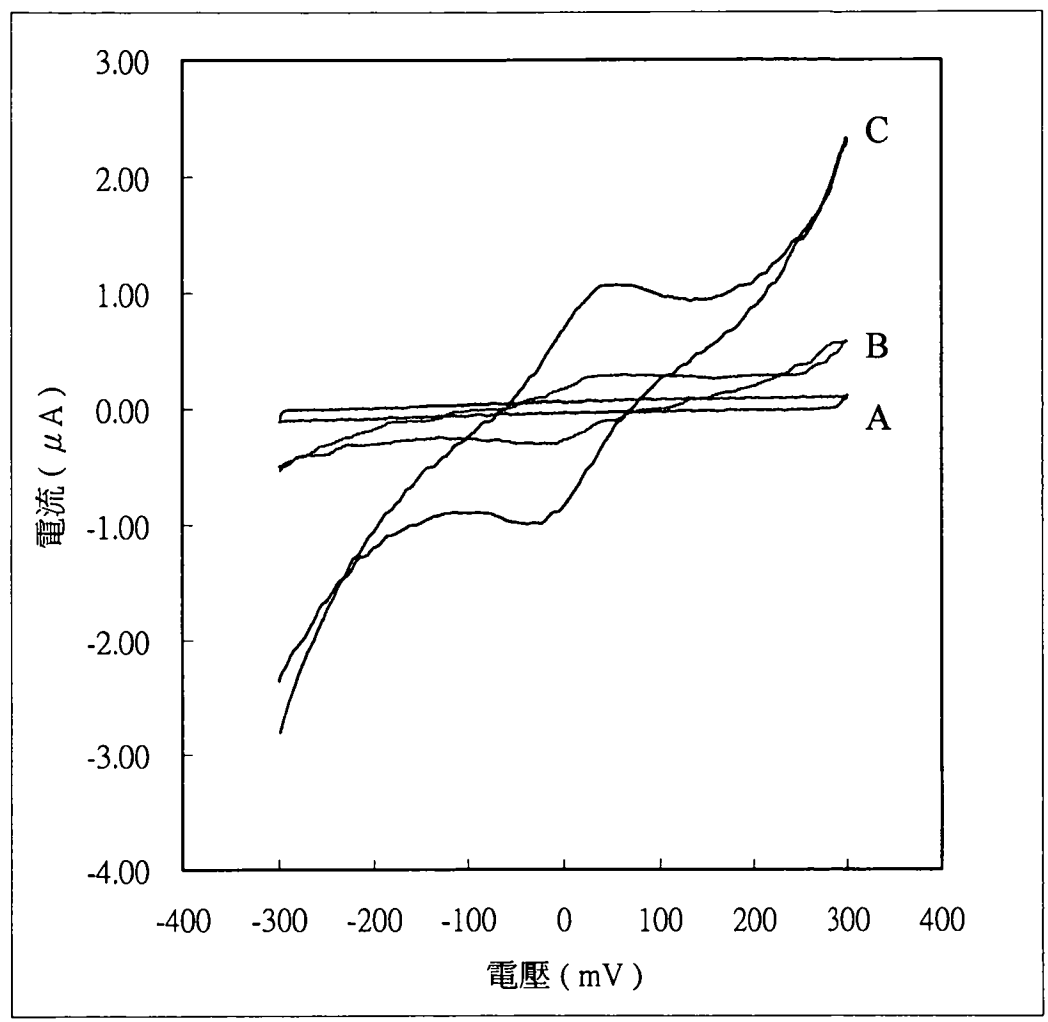


圖3

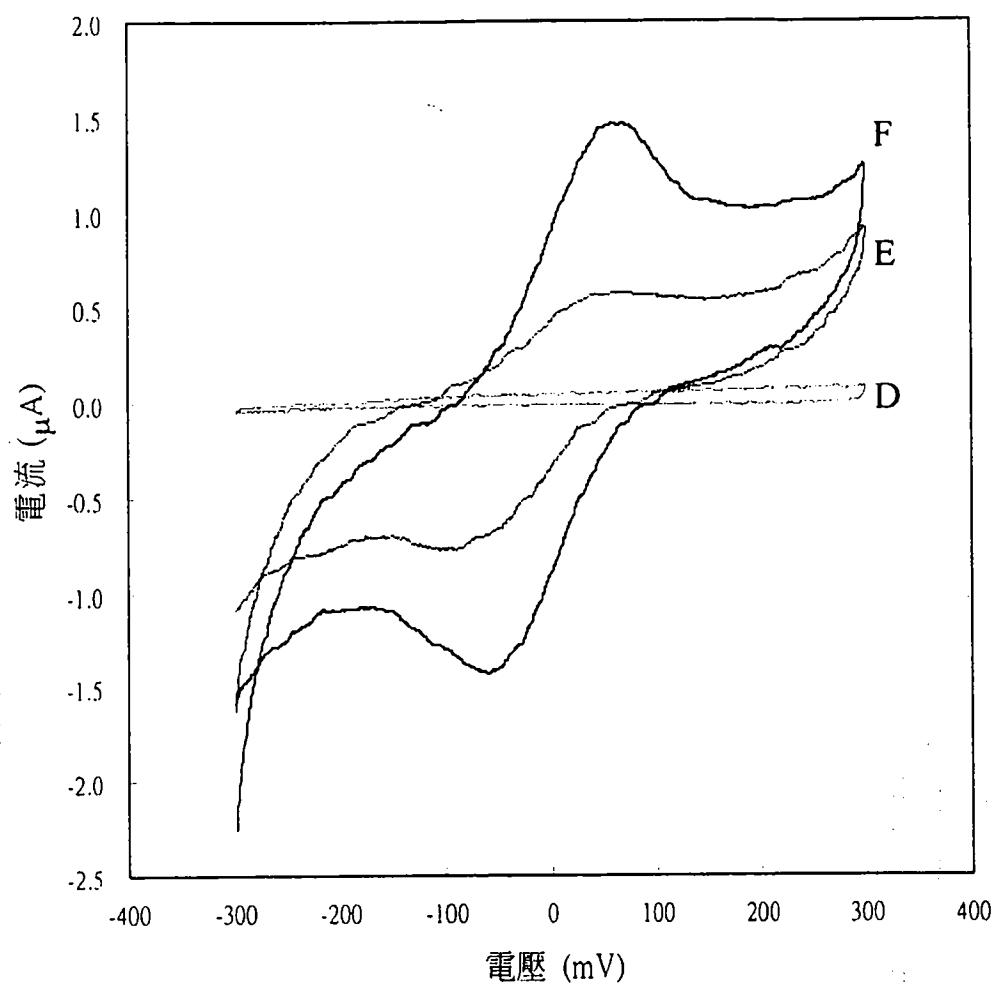


圖4

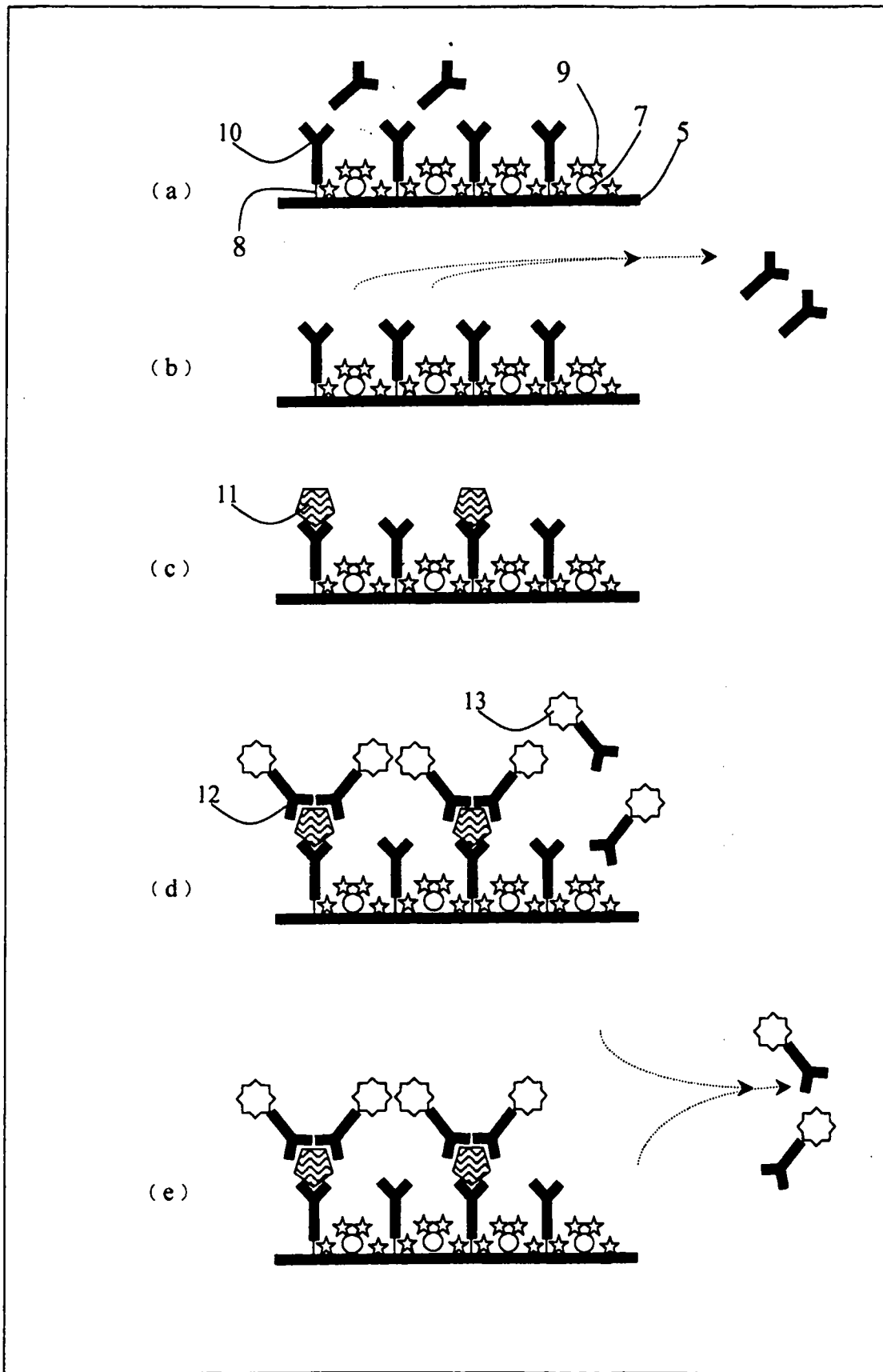


圖5

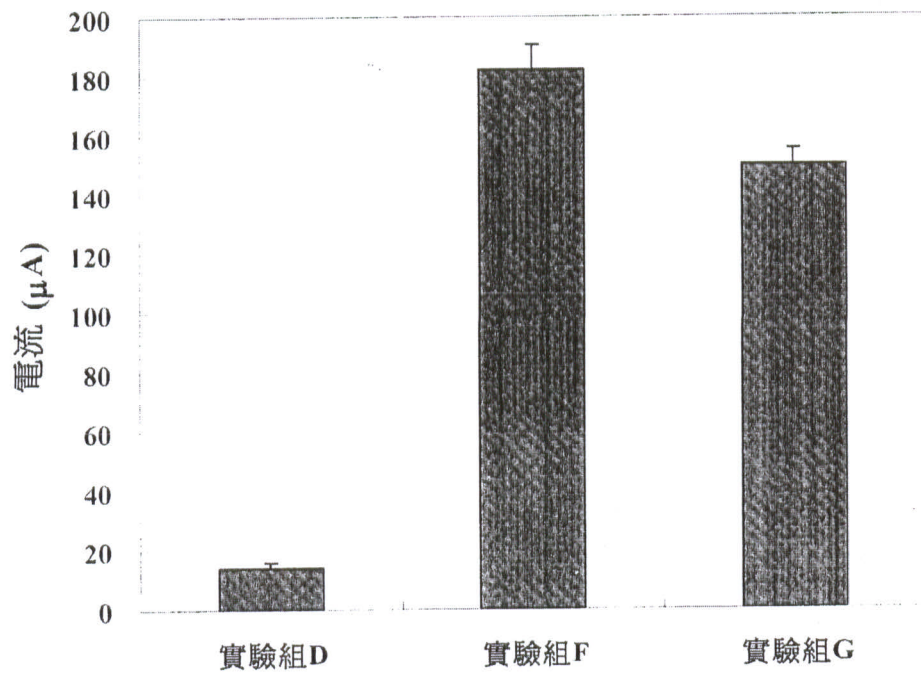


圖6