

發明專利說明書²⁰⁰⁵²⁸⁷¹⁶

(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：93135701

※ 申請日期：93 11 19

※IPC 分類：G01N³³/68

一、發明名稱：(中文/英文)

糖化蛋白質之測定方法

METHOD FOR MEASURING GLYCOSYLATED PROTEIN

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

日商第一化學藥品股份有限公司

DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.

代表人：(中文/英文)

蘆田 伸一郎

ASHIDA, SHIN-ICHIRO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都中央區日本橋三丁目13番5號

13-5, NIHONBASHI 3-CHOME, CHUO-KU, TOKYO 103-0027, JAPAN

國 籍：(中文/英文)

日本 JAPAN

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 谷口 由利子
TANIGUCHI, YURIKO
2. 海老沼 宏幸
EBINUMA, HIROYUKI
3. 齋藤 和典
SAITO, KAZUNORI

國 籍：(中文/英文)

- 1.-3.均日本 JAPAN

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. 日本；2003年11月19日；特願2003-389891

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

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。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種試料中之糖化蛋白質、糖化肽或者糖化胺基酸之測定方法，以及用於該測定方法之測定用試劑者。

【先前技術】

糖化蛋白質係蛋白質得以非酶性糖化之蛋白質，係於糖側之醛基與蛋白質側之胺基形成Schiff鹼後，經由阿馬多利(Amadori)重排而得以形成之阿馬多利化合物。糖化蛋白質廣泛存在於生物體內，其中血液中之糖化蛋白質濃度依存於溶解於血清中之葡萄糖等單糖之濃度。作為糖化蛋白質，可列舉蛋白質之胺基末端之 α -胺基得以糖化者(例如，糖化血紅蛋白)、蛋白質之內部離胺酸殘基之 ε -胺基得以糖化者(例如，糖化白蛋白)，血清中糖化白蛋白之濃度或紅血球中糖化血紅蛋白與非糖化血紅蛋白之存在比，反映過去一定期間之平均血糖值，故而作為糖尿病之診斷、病狀之管理、治療效果之判定等臨床診斷之指標而得以使用。

作為糖化蛋白質之測定方法，眾所周知有可適用於操作簡單，且廣泛應用於臨床檢查室之自動分析裝置之酶法(例如，參照日本專利特開平11-127895號公報)。酶法包含前處理步驟，其使蛋白質分解酶作用於試料中之糖化蛋白質，並使成為次一步驟之基質的糖化肽或者糖化胺基酸游離；以及測定步驟，其繼而將糖化肽特異酶或者糖化胺基

酸特異酶(例如，氧化酶)作用於游離之基質，生成可檢測之生成物(例如，過氧化氫)，從而測定該可檢測之生成物。

然而，由於所報告之酶法之於前處理步驟中之蛋白質分解酶以及於測定步驟中之特異酶無法嚴密識別糖化蛋白質、糖化肽、糖化胺基酸(以下，亦總稱為糖化蛋白質等)的各分子之不同處，因而於測定對象之糖化蛋白質等與測定對象外之糖化蛋白質等共存之情形時，存在上述特異酶亦會與該測定對象外之糖化蛋白質等反應，從而作為測定方法之特異性將會降低之問題。

作為用於上述測定步驟之糖化肽特異酶或者糖化胺基酸特異酶，先前眾所周知有棒狀桿菌屬菌所產生之氧化酶(例如，參照日本專利特公平5-33997號公報)，麴黴屬菌所產生之氧化酶(例如，參照日本專利特開平3-155780號公報)等，然而該等酶對糖化胺基酸可很好地作用，而對糖化肽則難以作用。最近，報告有將果糖基胺基酸氧化酶改變之酶(參照日本專利特開2001-95598號公報)、或者源於線狀菌之果糖基肽氧化酶(參照日本專利特開2003-235585號公報)，並設定該等氧化酶於pH 8.0之條件下對糖化肽，尤其對果糖基纈胺鹽基組胺酸產生特異作用。

於使用有上述般之果糖基胺基酸氧化酶之糖化血紅蛋白之測定中，對於血紅蛋白 β -亞單元之胺基末端之纈胺酸得以糖化之果糖基纈胺酸、或於果糖基纈胺酸中進而附加有一胺基酸之果糖基纈胺鹽基組胺酸與蛋白質中之離胺酸殘

基得以糖化之 ϵ -果糖基離胺酸的反應性之不同，將決定氧化酶之特異性。然而，於血紅蛋白分子中存在44個離胺酸殘基，即使對於 ϵ -果糖基離胺酸之反應性較低，亦無法忽視其影響。又，由包含源自血紅蛋白或其他血漿蛋白質(例如，糖化白蛋白等)或者源自食品、藥劑之果糖基離胺酸的化合物(以下亦稱為「果糖基離胺酸類」)所引起之正誤差係先前之方法所無法避免的。

【發明內容】

因此，本發明之目的在於提供一種可減輕果糖基離胺酸類之影響，並適用於各種自動分析裝置之簡便而有效之測定糖化蛋白質、果糖基肽或者果糖基胺基酸的方法及其測定用試劑。

本發明者們鑒於相關之實情而進行刻意研究，其結果，發現藉由於pH 4.0~7.0中使果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶產生特異性作用，而於糖化蛋白質、果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定中，可減輕存在於反應液中之果糖基離胺酸類之影響，從而完成本發明。

即，本發明係提供一種減輕果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定中果糖基離胺酸類之影響的方法，其特徵為：於果糖基肽或者果糖基胺基酸中，於pH 4.0~7.0中使果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶產生特異性作用，並以pH 4.0~7.0測定所獲得之生成物。

本發明又提供一種減輕試料中之糖化蛋白質之測定中果糖基離胺酸類之影響的方法，其特徵為：以蛋白質分解酶

處理含糖化蛋白質之試料，於pH 4.0~7.0中使果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶特異性作用於游離之果糖基肽或者果糖基胺基酸，並於pH 4.0~7.0中測定所獲得之生成物。

本發明又提供一種減輕果糖基離胺酸類之影響的糖化蛋白質測定用試劑，其至少包含(A)蛋白質分解酶，(B)於pH 4.0~7.0中特異性作用於果糖基肽或者果糖基胺基酸，從而生成過氧化氫之氧化酶，以及(C)用以測定過氧化氫之試劑。

本發明又提供一種於果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定中減輕果糖基離胺酸類之影響的方法，其特徵為：於pH 4.0~7.0中至少使(A)果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶、(B)用以測定過氧化氫之試劑以及(C)糖氧化分解酶作用於果糖基肽或者果糖基胺基酸。

本發明進而提供一種於糖化蛋白質之測定中減輕果糖基離胺酸類影響之方法，其特徵為：於pH 4.0~7.0中至少使(A)果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶、(B)用以測定過氧化氫之試劑以及(C)糖氧化分解酶作用於將含糖化蛋白質之試料以蛋白質分解酶進行處理而獲得之果糖基肽或者果糖基胺基酸。

根據本發明，可減輕果糖基離胺酸類之影響並正確測定糖化蛋白質、果糖基肽或者果糖基胺基酸。本發明之測定方法由於可以簡便操作進行測定，故而適用於各種分析方法，並於臨床檢查之領域中亦極為有用。

【實施方式】

糖化蛋白質只要為蛋白質與葡萄糖等醛糖進行非酶性結合而生成者則可為任何者。例如，可列舉糖化血紅蛋白、糖化白蛋白等，其中糖化血紅蛋白，尤其血紅蛋白A1c(HbA1c)作為測定對象使用較為理想。

作為含有糖化蛋白質之試料，可列舉全血、血球、血清、血漿、髓液、汗、尿、淚液、唾液、皮膚、黏膜、以及毛髮作為生物體試料。又，糖化蛋白質一般而言亦包含於飲料、調味料等食品中。其中作為試料，較好是全血、血球、血清、血漿。該等試料當然可直接用於測定，亦可於過濾或透析處理之後用於測定，又亦可將待測定之糖化蛋白質適當地以濃縮、萃取、進而以水或者下述緩衝液進行稀釋。

於本發明中，首先，使用蛋白質分解酶，使果糖基肽或者果糖基胺基酸自糖化蛋白質游離。蛋白質分解酶只要具有蛋白質分解活性、肽分解活性則並無特別限制，然而於短時間內有效使果糖基肽或者果糖基胺基酸，較好是使果糖基纈胺醯基肽或者果糖基纈胺酸游離者為佳。該蛋白質分解酶之起源可源自微生物、源自動物、源自植物等，其中任一者均可，並無特別限制。具體的是，可列舉蛋白酶K、胰蛋白酶、菠蘿蛋白酶、羧基肽酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胺基肽酶等作為研究用途之市場銷售品而可容易獲得者，中性蛋白酶、TOYOTEAM NEP(以上，為東洋紡公司製)、酸性鮮蛋白酶、鹼鮮蛋白酶、黴菌素、AO鮮蛋白酶、肽酶(以上，為基克曼公司製)、SMITEAM CP、

SMITEAM TP、SMITEAM LP50D(以上，為新日本化學工業公司製)、SAMOASE PC10F、PROTIN PC、PROTIN PC10F、PROTIN PS10、PROTIN NY10、PROTIN NL10、PROTIN NC25(以上，為大和化成公司製)、ACTINASE AS(科研製藥公司製)、PRONASE E(羅傑公司製)、UMAMIZAIM E、PROTEASE S「AMANO」G、PROTEASE A「AMANO」G、PROTEASE P「AMANO」3G(以上，為阿馬諾恩紫因公司製)等作為工業用而於市場上銷售者。該等蛋白質分解酶可藉由作用於果糖基肽等，並使用毛細管電泳分析/比較作用前後的試料，而確認效果。上述蛋白質分解酶既可單獨使用，亦可組合二種以上使用。於該等之中，較好是藉由源自桿菌屬、麴黴屬或者鏈黴素屬之微生物、或者其基因而產生者，或者屬於金屬蛋白酶、中性鮮蛋白酶、酸性鮮蛋白酶或鹼性鮮蛋白酶者。作為源自桿菌屬之酶，可列舉PROTIN PC10F、PROTIN NC25(大和化成公司製)、TOYOTEAM NEP(東洋紡公司製)等，作為源自麴黴屬之酶，可列舉黴菌素(基克曼公司製)，作為源自鏈黴素屬之酶，可列舉ACTINASE AS、ACTINASE AF、ACTINASE E(科研製藥)、鮮蛋白酶型-XIV(西格馬公司製)等。該等除可單獨使用以外，TOYOTEAM NEP等亦可與蛋白酶K混合而併用。

蛋白質分解酶之使用濃度如若為可有效游離作為目的之果糖基肽或者果糖基胺基酸的濃度，則無特別限制。可考慮所使用之酶的比活性等，而實驗性地適當設定使用濃

度。例如，添加 0.0001~50 mg/mL之源自麴黴屬菌之蛋白質分解酶(例如，黴菌素，基克曼公司製)，較好是添加 0.001~20 mg/mL。以蛋白質分解酶進行處理時之pH值無須進行特別調整，然而可以對於所使用之酶之作用達到較合適之pH值之方式，藉由適當pH調整劑，例如下述緩衝液而調整為pH 3.0~11.0。處理溫度較好是10~40℃。

作為緩衝液並無特別限制，可使用磷酸、鄰苯二甲酸、檸檬酸、Tris HCl、順丁烯二酸、琥珀酸、草酸、酒石酸、醋酸、固得(Good)(MES、PIPES、ADA等)之緩衝液等。緩衝液之濃度雖亦無特別限制，但可為0.00001~2 mol/L，更好是0.001~1 mol/L。

作為以蛋白質分解酶處理試料而獲得之游離的果糖基肽或者果糖基胺基酸，可列舉果糖基纈胺鹽基組胺酸、果糖基纈胺酸等。又，於生物體試料或食品中，於使蛋白質分解酶產生作用之前，已於糖化蛋白質得以分解而游離之肽或胺基酸中結合有葡萄糖，其後亦包含經由阿馬多利重排而生成之果糖基肽或者果糖基胺基酸，該等亦包含於游離之果糖基肽或者果糖基胺基酸中。

游離之果糖基肽或者果糖基胺基酸將使果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶產生作用，並可藉由測定該作用下之生成物而測定果糖基肽或者果糖基胺基酸。

作為該果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶，只要為可代謝游離之果糖基肽或者果糖基胺基酸者，則並無特別限制，例如，可列舉果糖基胺基酸氧化酶(日本專利特開

2003-79386號公報以及國際公開第97/20039號手冊)、氧代胺氧化酶(日本專利特開平5-19219號公報)、果糖基肽氧化酶(日本專利特開2001-95598號公報以及日本專利特開2003-235585號公報)等。於該等中，較好是果糖基肽氧化酶。該等酶可為源自微生物、源自動物、源自植物等之任一者，又可為藉由基因操作所獲得者。進而，不論有無化學修飾。該等酶既可為溶液狀態亦可為乾燥狀態，亦可保持或者結合於不溶性載體，可單獨或者組合2種以上使用。

該等酶之使用量根據酶之種類而不同，較好是0.001~1000單位/mL，尤其好的是0.1~500單位/mL。可考慮所使用之酶的比活性等，實驗性地適當設定使用濃度。而產生作用時之pH值可兼顧所使用之酶之最佳pH值，並達到獲得本發明之效果之pH 4.0~7.0，較好是4.0~6.7之方式使用緩衝液進行調整。作用溫度為例如10~40℃，可適當選擇用於通常之酶反應的溫度。該情形時之緩衝液與上述同樣，並無特別限制，可使用磷酸、鄰苯二甲酸、檸檬酸、Tris HCl、順丁烯二酸、琥珀酸、草酸、酒石酸、醋酸、固得緩衝液等。該等之中，磷酸、檸檬酸、ADA(N-(2-乙醯胺基)亞胺基二醋酸)對於果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶之保存安定性較為可靠，故較理想。緩衝液之濃度亦無特別限制，但可為0.00001~2 mol/L，更好是0.001~1 mol/L。

上述測定用酶可根據需要，與其他酶、輔酶、被氧化性

呈色試劑等組合使用。作為其他酶，可列舉過氧化酶、硫辛醯胺脫氫酶或者不以果糖基纈胺酸為基質之胺基酸代謝酶等。又，亦可使用用以處理抗壞血酸氧化酶、膽紅素氧化酶等血液中的雜質成分之酶。作為輔酶，可列舉煙醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、煙醯胺腺嘌呤二核苷酸還原型(NADH)、煙醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)、煙醯胺腺嘌呤二核苷酸還原型磷酸(NADPH)、硫代NAD、硫代NADP等。

作為被氧化性呈色試劑，只要為與過氧化氫反應而呈色者則可為任一者。例如，可列舉4-胺基安替比林與苯酚系、奈酚系或者苯胺系化合物之組合，以及3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脞與苯胺系化合物之組合等。作為可與4-胺基安替比林組合之苯酚系化合物，可列舉苯酚、p-氯苯酚、2,4-二氯苯酚、2,4-二溴苯酚、2,4,6-三氯苯酚等，作為苯胺系化合物，可列舉N,N-二甲基苯胺、N,N-二乙基苯胺、N,N-二甲基-m-甲苯胺、N,N-二乙基-m-甲苯胺、N-乙基-N-磺丙基-m-甲苯胺、N-乙基-N-(2-羥基-3-磺丙基)-m-甲苯胺(TOOS)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙醯基乙二胺、3-甲基-N-乙基-N-(羥基乙基)苯胺、N-乙基-N-(2-羥基-3-磺丙基)苯胺(ALOS)、N-乙基-N-(3-磺丙基)苯胺(ALPS)、N,N-二甲基-m-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(2-羥基-3-磺丙基)-m-甲氧基苯胺(ADOS)等。其他，亦可列舉N-(羧基甲基胺基羧基)-4,4'-雙(二甲胺基)-二苯胺·鈉鹽(DA-64)、10-(羧基甲基胺基羧基)-3,7-雙(二甲胺基)-吩噻嗪·鈉鹽(DA-

67)、10-N-甲基胺甲醯基-3,7-二甲基胺基-10H-吩噻嗪(MCDP)、N,N,N',N',N'',N''-六-3-磺丙基-4,4',4''-三胺基三苯基甲烷(TPM-PS)、二胺基聯苯胺、羥基苯基丙酸、四甲基聯苯胺、鄰對苯二胺等。

作為使上述測定用酶產生作用而獲得之生成物，例如可列舉肽、過氧化氫、以及鄰酮醛糖等。游離之果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定可藉由測定該等生成物而實行，但為了可於短時間簡單測定，較好的是測定過氧化氫。作為過氧化氫之測定方法，例如可列舉使用氧電極之電性方法，使用過氧化酶或者硫辛醯胺脫氫酶與上述著色劑之酶性方法，而後者之酶性方法較理想。

過氧化氫之測定通常係連續進行使上述測定用酶產生作用從而產生過氧化氫之步驟，而過氧化氫之測定溶液使用緩衝液調整為pH 4.0~7.0，較好是調整為pH 4.0~6.7。著色之程度(吸光度變化量)可藉由分光光度計測定，並與作為標準之已知濃度的果糖基肽或者果糖基胺基酸等吸光度進行比較，從而測定含於試料中之糖化蛋白質、果糖基肽或者果糖基胺基酸。

於本發明之測定方法中，亦可以分別實行使果糖基肽或者果糖基胺基酸游離之步驟與測定游離之果糖基肽或者果糖基胺基酸之步驟之方式測定糖化蛋白質，亦可以一個階段連續性地實行該等步驟之方式進行測定。

又，於本發明之測定方法中，將反應液或者測定液調整為pH 4.0~7.0，較好是pH 4.0~6.7，藉此可減輕對於果糖基

肽或者果糖基胺基酸之測定用酶的果糖基離胺酸類之影響。隨之，於測定游離之果糖基肽或者果糖基胺基酸之步驟中，必須調整於上述pH值。

本發明之減輕果糖基離胺酸類之影響的糖化蛋白質測定用試劑至少包含(A)蛋白質分解酶，(B)於pH 4.0~7.0中特異性作用於果糖基肽或者果糖基胺基酸而生成過氧化氫之氧化酶，以及(C)用以測定過氧化氫之試劑。進而，使上述(B)所揭示之氧化酶作用於果糖基肽或者果糖基胺基酸，進而使糖氧化分解酶作用於所產生之葡糖酮醛，生成過氧化氫從而可實現敏感度之增加(日本專利特開2000-333696號公報)。作為上述糖氧化分解酶，較好是選自由葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶以及吡喃糖氧化酶所組成之群中至少一種氧化酶。各酶以及試劑之具體說明如上所述。除此之外，於測定糖化血紅蛋白，尤其是血紅蛋白A1c時，可使用用以自紅血球提取血紅蛋白而用於反應之前處理劑等，亦可添加處理血液中之雜質成分之酶、反應調整劑、試劑之安定化劑，又，氯化鈉、氯化鉀、亞鐵氰化鉀等鹽，用以避免還原性物質之影響的四唑鎢鹽，作為防腐之抗生物質，以及疊氮化鈉等。

作為用以自上述紅血球提取血紅蛋白用於反應之前處理劑，可使用選自聚環氧乙烷衍生物之非離子系界面活性劑(例如三硝基甲苯(Triton)X-100等)、陰離子系界面活性劑等。該等界面活性劑之使用量，於按照需要實行過濾、透析處理等之試料中，為0.0001~10%，較好是0.001~1%。

本發明之糖化蛋白質測定用試劑不僅可提供溶液狀態，亦可提供為乾燥狀態或凝膠狀態。又，除了填充於玻璃瓶、塑料容器以外，亦可以對不溶性載體之塗布、含浸等形態提供。作為不溶性載體，例如，可列舉膠乳、玻璃、膠態等粒子・球狀載體，半導體或玻璃等平板狀載體，紙或硝化纖維素等膜狀載體，以及纖維狀載體。

實施例

以下列舉實施例進而詳細說明本發明，然而本發明並非僅限定於該等者。

[實施例1] 果糖基胺基酸之測定

(1)試料之調製

稱量果糖基纈胺酸(fV)、果糖基纈胺醯基組胺酸(fVH)(以上，巴伊奧圭斯特公司製)、以及 ϵ -果糖基離胺酸(fK)(基克曼公司製)，並分別使之溶於20 mmol/L磷酸緩衝液(pH 7.0)中，從而作成0.3 mmol/L濃度之試料。

(2)試料之測定

使用日立7150形自動分析裝置，並藉由以下操作實行各試料之測定。

<第一試劑>

0.1 mol/L磷酸緩衝液 實施例1；pH 5.5、pH 6.0、

pH 6.5、pH 7.0

比較例1；pH 7.5、pH 8.0

<第二試劑>

5單位/mL果糖基胺氧化酶(FPOX-CE，基克曼公司製)

20單位/mL過氧化酶(III)(東洋紡社製)

1 mmol/L N-乙基-N-(2-羥基-3-磺丙基)-m-甲苯胺(TOOS)

1 mmol/L 4-胺基安替比林

0.1 mol/L磷酸緩衝液 實施例1；pH 5.5、pH 6.0、
pH 6.5、pH 7.0

比較例1；pH7.5、pH8.0

(第一試劑與第二試劑以同一pH值之組合使用。)

於試料20 μ L中添加第一試劑240 μ L，並測定於37°C下加溫5分鐘後之吸光度(吸光度I)。其次，添加第二試劑80 μ L，並測定於37°C下加溫5分鐘後之吸光度(吸光度II)。吸光度之測定於主波長546 nm(副波長800 nm)中實行，並代替試料而使用生理食鹽水實行同樣操作(試劑空白組)作為對照組。

自各試料之吸光度I以及吸光度II使用式A算出各試料之吸光度變化量(測定值)。

式A：吸光度變化量(測定值)=吸光度II-(吸光度I $\times$
(20+240)/(20+240+80))

使用所獲得之各測定值，算出相對於果糖基纈胺酸之測定值的 ϵ -果糖基離胺酸之測定值之比(fK/fV)，以及相對於果糖基纈胺酸基組胺酸之測定值的 ϵ -果糖基離胺酸之測定值之比(fK/fVH)。又，將於pH 8.0條件下之fK/fV以及fK/fVH各自的測定值之比設為100%，比較各pH值條件之測定值之比。於表1表示結果。

表1

反應液之pH值	實施例1				比較例1	
	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
測定值之比：fK/fV(%)	0.8	2.1	5.7	12.8	23.8	32.3
對於fK/fV(pH 8.0)之比例(%)	2.5	6.5	17.6	39.6	73.7	100.0
測定值之比：fK/fVH(%)	1.0	2.5	6.8	14.9	27.5	42.2
對於fK/fVH(pH 8.0)之比例(%)	2.4	5.9	16.1	35.3	65.2	100.0

自表1可清楚瞭解，即使於fK/fV、fK/fVH中任意之情形下，實施例之測定值之比與比較例相比，為明顯較低之值。由此知悉本發明之方法對於fV、fVH之特異性較高，而與果糖基離胺酸類之反應性則較低。

[實施例2] 果糖基胺基酸之測定

(1)試料之調製

與實施例1相同，將果糖基纈胺鹽基組胺酸(fVH)(巴伊奧圭斯特公司製)以及 ϵ -果糖基離胺酸(fK)(基克曼公司製)溶於0.02 mol/L之磷酸緩衝液(pH 7.0)中，成為0.3 mmol/L濃度之試料。

(2)試料之測定

使用日立7150形自動分析裝置，並藉由以下之操作實行各試料之測定。

<第一試劑>

使用實施例1之第一試劑。

<第二試劑>

除以5單位/mL果糖基胺氧化酶(FPOX-CE)代替5單位/mL果糖基胺氧化酶(FPOX-EE)以外，使用與實施例1相同組成之第二試劑。

(第一試劑與第二試劑以同一pH值組合使用。)

實行與實施例1相同操作。並於表2表示結果。

表 2

反應液之pH值	實施例2				比較例2	
	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
fK/fVH(%)	0.0	0.5	3.2	2.3	10.3	19.5
對於FK/fVH(pH 8.0)之比例(%)	0.0	2.6	16.4	11.8	52.8	100.0

自表2可清楚瞭解，即使於使用與實施例1相異之果糖基肽氧化酶(FPOX-EE)之情形時，與比較例相比，fK/fVH亦大幅減少，對於果糖基纈胺醯基組胺酸之特異性較高，與果糖基離胺酸類之反應性則較低。

[實施例3] 果糖基胺基酸以及果糖基肽之測定

(1)試料之調製

分別稱量果糖基纈胺酸、果糖基纈胺醯基組胺酸(以上，巴伊奧圭斯特公司製)、以及 ϵ -果糖基離胺酸(基克曼公司製)，並溶解於0.02 mol/L磷酸緩衝液(pH 7.0)中，成為0.6 mmol/L濃度之溶液。將等量之0.02 mol/L磷酸緩衝液(pH 7.0)或者0.6 mmol/L ϵ -果糖基離胺酸溶液混合於0.6 mmol/L果糖基纈胺酸溶液以及0.6 mmol/L果糖基纈胺醯基組胺酸溶液中，成為0.3 mmol/L果糖基纈胺酸試料、0.3 mmol/L果糖基纈胺醯基組胺酸試料、或者與 ϵ -果糖基離胺酸之混合試料(各基質之濃度為0.3 mmol/L)。

(2)試料之測定

使用日立7150形自動分析裝置，藉由以下操作實行各試料之測定。

<第一試劑>

使用實施例1之第一試劑中pH 5.5與pH 6.5者，以及比較

例1中pH8.0者。

<第二試劑>

使用實施例1之第二試劑中pH 5.5與pH 6.5者，以及比較例1中pH 8.0者。

(第一試劑與第二試劑以共同之pH值組合使用。)

實行與實施例1同樣操作，算出相對於果糖基纈胺酸試料之測定值的果糖基纈胺酸與 ϵ -果糖基離胺酸之混合試料的測定值之比 $((fV+fK)/fV)$ ，以及相對於果糖基纈胺酸基組胺酸試料之測定值的果糖基纈胺酸基組胺酸與 ϵ -果糖基離胺酸之混合試料的測定值之比 $((fVH+fK)/fVH)$ 並加以評估。結果示於表3。

表3

反應液之pH值	實施例3		比較例3
	5.5	6.5	8.0
$(fV+fK)/fV(\%)$	101.6	106.2	138.0
$(fVH+fK)/fVH(\%)$	101.7	108.8	141.6

自表3可清楚瞭解，與比較例3相比，於實施例3中 ϵ -果糖基離胺酸之影響得以大幅度減輕。

[實施例4] 血紅蛋白A1c(HbA1c)%之測定

(1)試料之調製

將使用包含EDTA作為抗凝固劑之採血管，藉由通常方法自被檢測者15人所採血之全血，於冷室中靜置一晚，使紅血球沉澱。自沉澱之紅血球層提取10 μ L，於其中加入300 μ L之0.1%三硝基甲苯(Triton) X-100水溶液並混合，調製血球溶血液試料。

五、中文發明摘要：

本發明之目的在於提供一種可減輕果糖基離胺酸類之影響，並且簡單有效之測定糖化蛋白質、果糖基肽或者果糖基胺基酸之方法以及測定用試劑。

本發明係關於一種於試料中之果糖基肽或者果糖基胺基酸的測定中果糖基離胺酸類影響減輕之方法，以及使用其之糖化蛋白質的測定方法，其特徵為：於果糖基肽或者果糖基胺基酸中以pH 4.0~7.0使果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶行特異性作用，並以pH 4.0~7.0測定所獲得之生成物。

六、英文發明摘要：

8. 如請求項1至7中任一項之減輕果糖基離胺酸類之影響的方法，其中所獲得之生成物為過氧化氫。
9. 一種減輕果糖基離胺酸類之影響的糖化蛋白質測定用試劑，其特徵為：其至少包含(A)蛋白質分解酶，(B)以pH 4.0~7.0特異性作用於果糖基肽或者果糖基胺基酸而生成過氧化氫之氧化酶，以及(C)用以測定過氧化氫之試劑。
10. 一種果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定中減輕果糖基離胺酸類之影響的方法，其特徵為：於果糖基肽或者果糖基胺基酸中，於pH 4.0~7.0下，至少使(A)果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶，(B)用以測定過氧化氫之試劑，以及(C)糖氧化分解酶彼此作用。
11. 一種糖化蛋白質之測定中減輕果糖基離胺酸類之影響的方法，其特徵為：其於以蛋白質分解酶處理含糖化蛋白質之試料所獲得之果糖基肽或者果糖基胺基酸中，於pH 4.0~7.0下，至少使(A)果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶，(B)用以測定過氧化氫之試劑，以及(C)糖氧化分解酶彼此作用。
12. 如請求項11之減輕果糖基離胺酸類之影響的方法，其中糖化蛋白質為糖化血紅蛋白。
13. 如請求項11或12之減輕果糖基離胺酸類之影響的方法，其中蛋白質分解酶為源自桿菌屬、麴黴屬或者鏈黴素屬之微生物，或者將該微生物之基因重組操作而獲得者。
14. 如請求項10至13中任一項之減輕果糖基離胺酸類之影響的方法，其中果糖基肽為果糖基纈胺醯基組胺酸。

15. 如請求項10至13中任一項之減輕果糖基離胺酸類之影響的方法，其中果糖基胺基酸為果糖基纈胺酸。
16. 如請求項10至15中任一項之減輕果糖基離胺酸類之影響的方法，其中果糖基肽或者果糖基胺基酸之測定用酶為果糖基肽氧化酶。

十一、圖式：

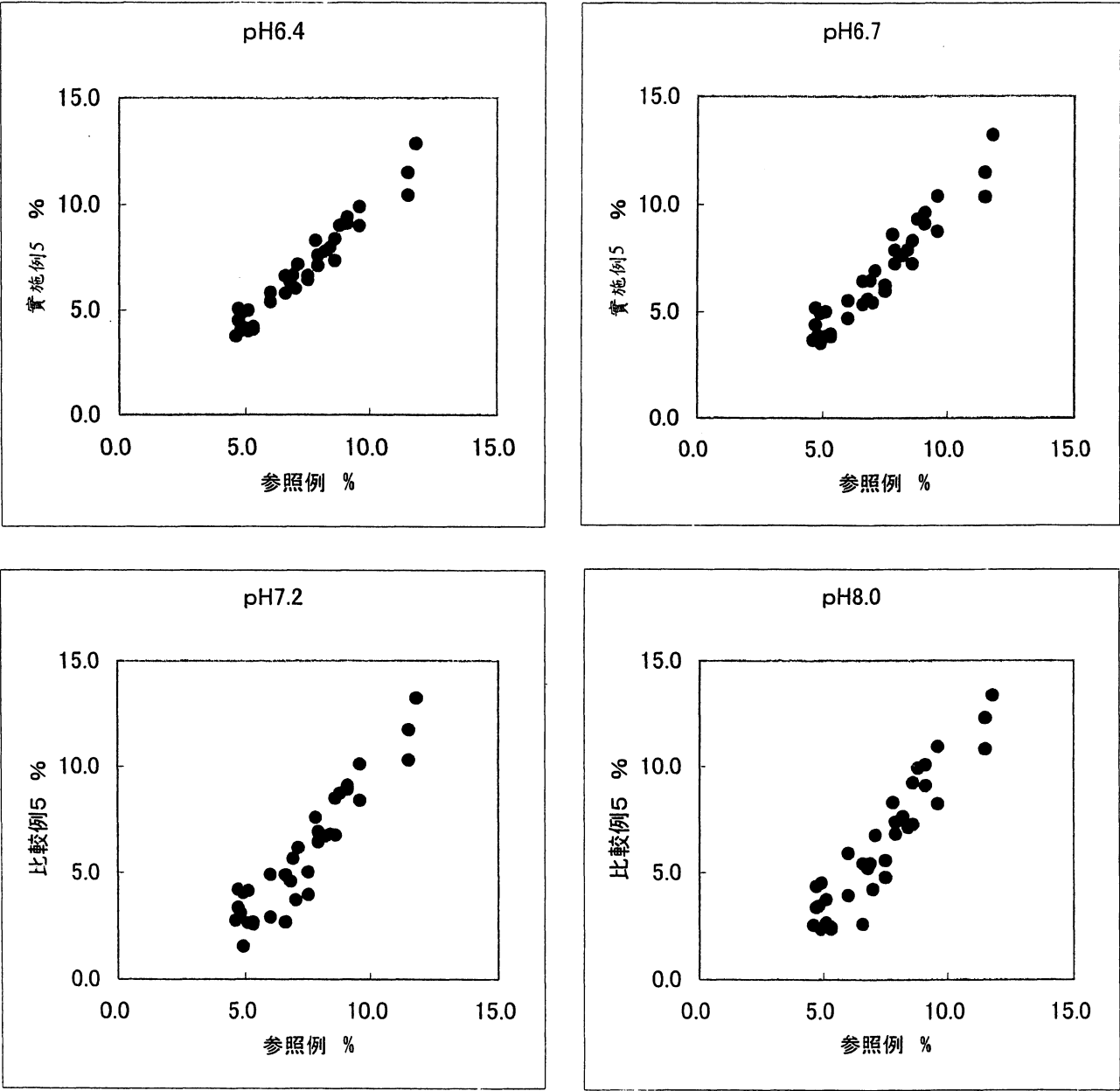


圖1

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

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)