

(19)日本国特許庁(J P)

# (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 121445

(P2003 - 121445A)

(43)公開日 平成15年4月23日(2003.4.23)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	521		G 0 1 N 33/543	521
	541			541 Z
	581			581 A
33/53			33/53	D
				V

審査請求 未請求 請求項の数 47 O L (全 39数)

(21)出願番号 特願2001 - 311945(P2001 - 311945)

(22)出願日 平成13年10月9日(2001.10.9)

(71)出願人 501393472

劉 永詳

台灣台北市南港路三段130巷3弄11號3樓

(71)出願人 501393450

陳 詠儀

台灣台北市南港路三段130巷3弄11號3樓

(72)発明者 劉永詳

台灣台北市南港路三段130巷3弄11號3樓

(72)発明者 陳詠儀

台灣台北市南港路三段130巷3弄11號3樓

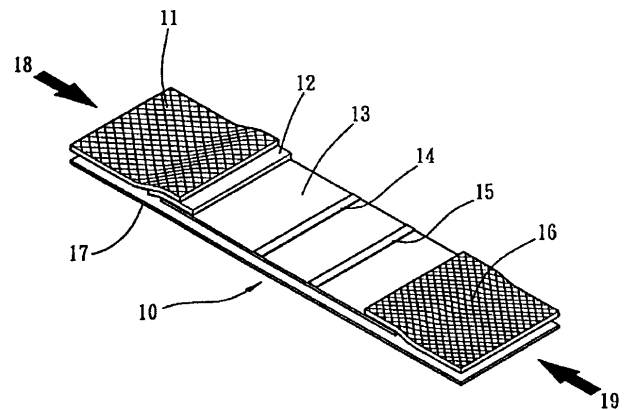
(74)代理人 100087918

弁理士 久保田 耕平

(54)【発明の名称】 グリコシル化蛋白質の免疫分析方法およびその装置

(57)【要約】 (修正有)

【課題】本発明は、グリコシル化蛋白質、(例えば最終グリコシル化生成物)の免疫分析方法、その試薬および装置を提供する。グリコシル化蛋白質を測定する試薬は、表示担体懸濁液と該担体上に固定化された抗原または抗体からなり、テストストリップ10は、ベースプレート17および該ベースプレート上に設けた構成部材とからなる。該構成部材は、多孔性の繊維フィルム13と、表示担体繊維ブロック12と、少なくとも1以上の固定物質を含んでなり、凝集現象またはこれに伴う吸光度の変化、色の変化によってグリコシル化蛋白質抗原と抗グリコシル化蛋白質抗体との免疫反応を測定でき糖尿病患者のA G E sの存否を容易に把握できる。従って、医療分野において早期に糖尿病の最終糖化蛋白質が存在するか否かを知って糖尿病の予防、併発症状進行を抑止するための措置をとることができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 グリコシル化蛋白質を測定する試薬であって、表示担体の懸濁液と、該表示担体上に固定化された親和性物質とを含んでなり、被測定サンプルと該試薬とを接触させて凝集現象が発生するか否かによって、該被測定サンプル中にグリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体が存在するか否かの判断に使用することを特徴とするグリコシル化蛋白質の測定用試薬。

【請求項 2】 前記表示担体が、着色微粒子である請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 3】 前記表示担体の粒径が、約 0.01 ~ 60  $\mu\text{m}$  の範囲にある請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 4】 前記試薬が、グリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体を測定するためのものである請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 5】 前記親和性物質が、グリコシル化蛋白質抗原である請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 6】 前記親和性物質が、多種の構造を有するグリコシル化蛋白質抗原である請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 7】 前記親和性物質が、抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 8】 前記親和性物質が、多種の抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 9】 前記試薬が、競合反応法を応用したグリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体の測定用試薬である請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 10】 前記試薬が、サンドイッチ法を応用してグリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体の測定用試薬である請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 11】 グリコシル化蛋白質を測定する試薬であって、表示担体の懸濁液と、該表示担体上に固定化された親和性物質とを含んでなり、測定サンプルと該試薬とを接触させて吸光度を測定する装置によって該表示担体に吸光度の変化が発生するか否かを測定して、グリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体が存在するか否かの判断に使用することを特徴とするグリコシル化蛋白質の測定用試薬。

【請求項 12】 前記表示担体が、着色微粒子または酵素である請求項 11 に記載の試薬。

【請求項 13】 前記微粒子が、ラテックス微粒子、リポソーム、染料微粒子、ポリスチレングリコール微粒子、NADH 微粒子、NAD 微粒子、重合体微粒子およびカーボン微粒子から選択される請求項 12 に記載の試薬。

【請求項 14】 前記表示担体の吸光度が、260 ~ 840 nm の範囲にある請求項 11 に記載の試薬。

【請求項 15】 前記表示担体の粒径が、0.001 ~ 20  $\mu\text{m}$  の範囲にある請求項 11 に記載の試薬。

【請求項 16】 前記親和性物質が、グリコシル化蛋白質抗原である請求項 11 に記載の試薬。

【請求項 17】 前記親和性物質が、多種の構造を有するグリコシル化蛋白質抗原である請求項 11 に記載の試薬。

【請求項 18】 前記親和性物質が、抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 11 に記載の試薬。

【請求項 19】 前記親和性物質が、多種の抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 11 に記載の試薬。

【請求項 20】 前記試薬が、グリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体の測定用試薬である請求項 11 に記載の試薬。

【請求項 21】 前記試薬が、競合反応法を応用した測定用試薬である請求項 20 に記載の試薬。

【請求項 22】 前記試薬が、サンドイッチ法を応用した測定用試薬である請求項 20 に記載の試薬。

【請求項 23】 グリコシル化蛋白質を測定する免疫クロマトグラフィー分析装置であって、ベースプレートと、該ベースプレート上に設けられた構成部材とからなるテストストリップ (test strip) を含み、該構成部材は、

a) 該テストストリップの前端縁部に設けられ、その後端縁部が多孔性繊維膜の前端と上下に対応する吸水パッドと、

b) 該ベースプレート上に設けられ、上面に判定領域部が形成されるとともに背面に表示担体繊維ブロックが設けられた多孔性繊維膜と、

c) 該サンプル吸水パッドの後端縁部と、該多孔性繊維膜の前端縁部とが重なり合う部分において両部材の間に介在し、その表面に親和性物質が固定化された表示担体を有する表示担体繊維ブロックと、

d) 該多孔性繊維膜上の判定領域部内に位置する少なくとも 1 以上の固定化物質とを含んでなり、

該テストストリップにより、吸水パッドに被測定サンプルを添加した後、該判定領域部に発生する反応によって該被測定サンプル中にグリコシル化蛋白質抗原または抗体が存在するか否かを判断することを特徴とする免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 24】 前記多孔性繊維膜が、ナイロン繊維膜、硝酸セルロース繊維フィルム、ポリエステル繊維膜、セルロース繊維膜または重合体繊維膜である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 25】 前記多孔性繊維膜の細孔径が、0.1 ~ 60  $\mu\text{m}$  の範囲にある請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 26】 前記表示担体が、着色微粒子、酵素または蛍光物質である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 27】 前記微粒子が、ラテックス微粒子、染料微粒子、ゴールド・コロイド微粒、カーボンブラック微粒子、リポソームおよび重合微粒子などから選択される請求項 26 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 28】 前記表示担体の粒径が、0.01 ~ 20 μm の範囲にある請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 29】 前記親和性物質が、一種の構造を有するグリコシル化蛋白質抗原である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 30】 前記親和性物質が、多種の構造を有するグリコシル化蛋白質抗原である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 31】 前記親和性物質が、抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 32】 前記親和性物質が、多種の抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 33】 前記固定化物質が、一種の構造を有するグリコシル化蛋白質抗原である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 34】 前記固定化物質が、多種の構造を有するグリコシル化蛋白質抗原である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 35】 前記固定化物質が、抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 36】 前記固定化物質が、多種の抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 37】 前記免疫クロマトグラフィー分析装置が、グリコシル化蛋白質抗原またはグリコシル化蛋白質抗体を測定するためのものである請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 38】 前記表示担体が、直接表示担体である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 39】 前記表示担体が、間接表示担体である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 40】 前記多孔性繊維膜上の判定領域部後方に適宜な距離を置いて対照領域部を設け、該対照領域部に抗体または抗原を固定化する請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 41】 前記免疫クロマトグラフ分析装置 \*50

\*が、光学測定による結果を測定または定量分析するために有用な装置である請求項 23 に記載の免疫クロマトグラフィー分析装置。

【請求項 42】 表示担体を含む懸濁液を利用したグリコシル化蛋白質の測定方法であって、該表示担体上に親和性物質が固定化され、測定サンプルと該懸濁液とを混合して、該混合液に凝集現象が発生するか否かによって該測定サンプル中にグリコシル化蛋白質抗原または抗体が存在するか否かを判断することを特徴とするグリコシル化蛋白質の測定方法。

【請求項 43】 前記親和性物質が、抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 42 に記載のグリコシル化蛋白質の測定方法。

【請求項 44】 前記親和性物質が、グリコシル化蛋白質抗原である請求項 42 に記載のグリコシル化蛋白質の測定方法。

【請求項 45】 表示担体を含む懸濁液を利用したグリコシル化蛋白質の測定方法であって、該表示担体上には親和性物質が固定化され、適宜量の表示担体を含む懸濁液を異なる比色管内において被測定サンプルと、陽性標準溶液と、陰性標準溶液とをそれぞれ混合し、適宜な吸光度測定装置で個別の吸光度値の変化を測定し、比濁分析法により比濁度の測定を行うことを特徴とするグリコシル化蛋白質の測定方法。

【請求項 46】 前記親和性物質が、抗グリコシル化蛋白質抗体である請求項 45 に記載のグリコシル化蛋白質の測定方法。

【請求項 47】 前記親和性物質が、グリコシル化蛋白質抗原である請求項 45 に記載のグリコシル化蛋白質の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、グリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体の免疫分析方法、試薬およびその装置に関し、特に凝集現象または吸光度の変化または色の変化によってグリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体の免疫反応を測定する免疫分析方法、試薬およびその装置に関する。

【0002】

【従来の技術】今日、糖尿病の発病メカニズムについては、すでに十分に把握されている。例えば、多糖症が発症している場合に、蛋白質（例えばアルブミン）がグリコシル化されてグリコシル化蛋白質（例えば、最終グリコシル化生成物《Advanced Glycosylation End Products》（AGEs））となり、特に糖尿病患者にとって細胞の異常な破壊を招くことが知られている。また、現在においては薬品によって糖尿病患者の血糖値を効果的に抑制することができるが、早期診断により糖尿病の併発症状に対し効果的に対処することはなお困難である。

従って、医療側が糖尿病患者の併発症状の発生を最も初

期の段階で予防することができ、もしくは併発症状が継続して進行することを抑制できるように糖尿病のAGE（最終グリコシル化生成物）が存在するか否かを測定するための特定の方法及び試薬の開発が望まれている。このような糖尿病のAGEの測定に利用される特定の方法及びその試薬のなかで最も特異性と感受性を具えたものは免疫分析技術を利用して、グリコシル化蛋白質抗原または抗体、例えば、最終グリコシル化生成物を測定する方法である。しかしながら、今日に至るもグリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体を測定する免疫分析技術は提供されていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の課題は、前記の情況に鑑み、糖尿病における最終グリコシル化生成物(AGEs (Advanced Glycosylation End Products))を測定するための分析技術の開発に着目し、グリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体を測定する免疫分析技術またはその装置を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】そこで、前述に鑑みて本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、グリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体の免疫分析技術またはその分析装置を開発した。該免疫分析技術および装置は、基本的には凝集現象またはこれに伴う吸光度の変化または色の変化によってグリコシル化蛋白質抗原またはグリコシル化蛋白質抗体の免疫反応を測定するものであって、これによって本発明の完成に到達した。

【0005】すなわち、本発明は、その一側面において、抗グリコシル化蛋白質抗体(抗原)を使用してグリコシル化蛋白質抗原(抗体)を測定する免疫分析技術を提供するものであり、これは、該免疫分析技術を利用し、凝集現象またはこれに伴う吸光度の変化または色の変化によって被測定サンプル中にグリコシル化蛋白質抗原または抗体が存在するか否かを測定するものである。

【0006】また、本発明は、他の側面において、抗グリコシル化蛋白質抗体(抗原)を使用してグリコシル化蛋白質抗原(抗体)を測定するための免疫分析試薬を提供するものである。これは、該試薬により、例えば抗グリコシル化蛋白質抗体とグリコシル化蛋白質抗原(最終グリコシル化生成物(AGEs)抗原)との免疫複合体の形成により生ずる凝集現象に基づき被測定サンプル中にグリコシル化蛋白質抗原または抗体が存在するか否かを判定することができる。

【0007】さらに、本発明は、その他の側面において、抗グリコシル化蛋白質抗体(抗原)を使用してグリコシル化蛋白質抗原(抗体)を測定する免疫分析試薬を提供するものであり、該試薬によれば、例えば抗グリコシル化蛋白質抗体とグリコシル化蛋白質抗原(例えば最終グリコシル化生成物(AGEs)抗原)との免疫複合

体の形成により生ずる吸光度の変化を介して被測定サンプル中にグリコシル化蛋白質抗原または抗体が存在するか否かを判定することができる。

【0008】また、本発明は、その他の側面において、抗グリコシル化蛋白質抗体(抗原)を使用してグリコシル化蛋白質抗原(抗体)を測定する免疫分析テストストリップ(test strip)を提供するものであり、該テストストリップを使用することにより、ベースプレート上において、例えば抗グリコシル化蛋白質抗体とグリコシル化蛋白質抗原(最終グリコシル化生成物(AGEs)抗原)との免疫複合体の形成により対照線に対して生ずる色の変化によってグリコシル化蛋白質抗原または抗体が存在するか否かを判定するものである。

【0009】本発明の特徴、目的および長所は、添付の図面を参照すれば以下の説明から明らかである。

【0010】図1は、本発明による免疫クロマトグラフィーテストストリップ(test strip)の構造を表わす斜視図である。図2は、防水装置のボックスの外観を表わす斜視図である。該防水装置ボックスは、図1に開示する免疫クロマトグラフィーテストストリップを収納するためのものである。図3は、図2に開示する防水装置ボックスに、本発明による免疫クロマトグラフィーテストストリップを収納した状態の断面図である。

【0011】

【発明の実施の形態】前記の如く、本発明は、数種類の免疫分析技術によって被測定サンプル中に例えば最終グリコシル化生成物(AGEs)の如きグリコシル化蛋白質抗原が存在するか否かを測定する技術に関するものである。本発明において、用いられる抗体は、精製された抗原(例えばAGE抗原)で、直接免または山羊を免疫して得られるもの(例えばポリクローナル抗体)またはマウスの免疫によって、ハイブリドーマとして得られるもの(例えば、モノクローナル抗体)でもよい。

【0012】従来の免疫分析技術については、例えば、Fujikawa H.およびIgarashi H.が1998年に発表した文献(Appl, Envir, Microbiol., 54/10, 2345-2348, 1998)には、高密度ラテックス顆粒によって生成される即効性エマルジョン凝集試薬を利用してブドウ球菌のエンテロトキシン(Enterotoxin)A~Eを検査する方法が開示されている。また、Delanghe, JR., Chapele, J. P. およびVander schuere, S C.は、ミオグロビン(Myoglobin)を比色法で測定する方法を発表した(Clin. Chem., 36/9, 1675-1678, 1990)。さらに、国際特許公開WO 88/08534(1988)には、免疫クロマトグラフィー膜を媒体としてHCGおよびLHを測定するための免疫分析装置が開示されており、米国特許第5,238,652号(1993)には免疫クロマトグラフィー技術を利用して非蛋白質抗原を測定する方法が開示されている。

【0013】しかしながら、前記の技術には、いずれも本発明において開示されたグリコシル化蛋白質抗原また

は抗グリコシル化蛋白質抗体を測定する免疫分析技術と装置について何らの開示もない。

【0014】本発明は、その一側面において、グリコシル化蛋白質抗体（抗原）によってグリコシル化蛋白質抗原（抗体）を測定する免疫分析試薬を提供するものである。これは、免疫凝集技術を利用して被測定サンプル中にグリコシル化蛋白質抗原または抗体（例えば、最終グリコシル化生成物（AGEs）抗原）が存在するか否かについて測定するものであって、表示担体懸濁液を含んでなるものである。

【0015】該表示担体懸濁液および該表示担体の表面に固定化されたグリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体により、該懸濁液試薬と被測定サンプルとの接触により生ずる凝集現象によってグリコシル化蛋白質抗原または抗体が存在するか否かを測定することができる。

【0016】本発明の一実施態様においては、一種または二種以上のグリコシル化蛋白質抗体は、懸濁液の表示担体上に固定化され、さらに阻害蛋白（blocking protein）が担体の空隙を充填させるために使用される。例えば最終グリコシル化蛋白質抗原など一定量のグリコシル化蛋白質抗原（例えば、最終グリコシル化生成物（AGEs）抗原）を含む被測定サンプルと、すでに一種または二種以上の抗体が固定化された表示担体の懸濁液とを反応板上で混合させて反応させる場合、一種の「表示担体抗体、または多種の抗体 - AGEs - 抗体、または多種の抗体 - 表示担体.....等」となる免疫複合体が形成される。この反応は3～5分以内に形成され、肉眼で確認できる凝集反応であって、陽性反応（positive response）である。逆に被測定サンプル中にAGEs抗原が存在しない場合は、すでに一種または二種以上の抗体が固定化された表示担体懸濁液と混合しても凝集反応が発生しない。これは陰性反応（negative response）である。

【0017】本発明における表示担体は、着色微細顆粒であって、その粒径は0.01～60μmの範囲にある。該顆粒は、ラテックス微粒子、染料微粒子、リポソーム、コロイド状金微粒子、カーボンブラック微粒子などである。

【0018】また、ここで用いられる用語「抗体」は、前記の一種または二種以上の抗グリコシル化蛋白質抗体を意味する。表示担体上に一種の構造のグリコシル化蛋白質抗原または数種類の構造のグリコシル化蛋白質抗原を固定化したものは、被測定サンプル中に該グリコシル化蛋白質抗原の抗体が存在するか否かを測定するために用いることができる。また、非凝集反応は陰性の反応であって、凝集反応は陽性の反応である。

【0019】本発明は、他の側面において、グリコシル化蛋白質抗体（グリコシル化蛋白質抗原）を使用してグリコシル化蛋白質抗原（グリコシル化蛋白質抗体）を測定する免疫分析試薬を提供するものであって、免疫比濁

測定技術によってグリコシル化蛋白質抗原または抗グリコシル化蛋白質抗体（例えば、最終グリコシル化生成物（AGEs）抗原または抗体）を測定することからなり、表示担体懸濁液と、吸光度測定装置を含んでなる。

【0020】該表示担体懸濁液は、表示担体表面に前記のグリコシル化蛋白質抗原または抗体が固定化され、該吸光度測定装置によれば、前記試薬と被測定サンプルとが接触した後、吸光度の変化により、該グリコシル化蛋白質抗原または抗体が存在するか否かを測定することができる。

【0021】本発明の一実施態様においては、一種または二種以上のグリコシル化蛋白質抗体を懸濁液の表示担体上に固定化して、さらに一種の阻害蛋白質を利用して担体の空隙に充填させる。陰性標準血清、弱陽性標準血清および未測定のサンプルとを用意する。また一種または二種以上の抗体を含む表示担体懸濁液をそれぞれ250マイクロリットルずつ入れた3本の比色試験管A1、A2、A3を用意し、A1の比色試験管には、20マイクロリットルの陰性標準血清を添加し、A2の比色試験管には20マイクロリットルの弱陽性標準血清を添加し、A3の試験管には20マイクロリットルの未測定のサンプルを添加する。該3本の比色試験管にサンプルを添加した後、直ちに、比濁度または吸光度を340nmで測定（予め空気をリセットする）し、それぞれのOD値（光吸収度値）を記録するとともに、サンプル添加後240秒を経過した時点で再度それぞれのOD値を記録する。第1回目に記録されたOD値から第2回目に記録されたOD値を差し引いた数値差が免疫反応のOD値である。この場合、このようにして得られた三つのOD値差を比較すると、未測定のサンプルのOD値差が弱陽性標準血清のOD値差に比して大きい場合は陽性反応である。一方、未測定のサンプルのOD値差が弱陽性標準血清のOD値差に比して小さい場合は陰性反応である。さらに、例えば、0単位/ml、1単位/ml、2単位/ml、4単位/ml、8単位/ml、16単位/mlと濃度が判明している一連の標準液を用いる場合は、測定サンプルの濃度は、該標準液により得られるデータからプロットした標準曲線に基づいて算出することができる。

【0022】本発明における表示担体は、一種の微粒子または酵素であって、該微粒子はラテックス微粒子、リポソーム、ポリエチレングリコール微粒子、NAD微粒子、カーボン微粒子、染料微粒子、酵素、NADH微粒子などであり、粒径は0.001～20μmであり、分光測定による範囲（spectrophotometric range）は260nm～840nmである。

【0023】ここで用いられる用語「抗体」は前記の一種または二種以上の抗グリコシル化蛋白質抗体を意味する。表示担体上に一種の構造によるグリコシル化蛋白質抗原または数種類の構造によるグリコシル化蛋白質抗原

10

20

30

40

50

を固定化すれば、測定サンプル中にグリコシル化蛋白質抗原の抗体が含まれるか否かの測定に用いることができる。また、競合反応法を使用しても、当然同様の実験結果が得られる。例えば、前記と同様に一定量の既に濃度が判明しているグリコシル化蛋白質抗原または抗体をそれぞれ測定サンプル、陽性標準液、陰性標準液と、同時に表示担体(該表示担体上に抗体または抗原が固定されている。)懸濁液とそれぞれ反応させれば前記と同様の測定結果を得ることができる。

【0024】また、本発明のさらに他の側面においては、抗グリコシル化蛋白質抗体(抗原)によってグリコシル化蛋白質抗原(抗体)を測定する免疫分析テストストリップを提供するものであり、該テストストリップにより免疫クロマトグラフィー分析技術を利用して測定サンプル中にグリコシル化蛋白質抗原または抗体(例えば、最終グリコシル化生成物(AGEs)抗原または抗体)が存在するか否かを測定することができる。

【0025】図1を参照すると、免疫クロマトグラフィーテストストリップ(10)は、多孔性繊維膜(13)であって、ベースプレート(17)上に接着される。サンプル用の吸水パッド(11)は、テストストリップ(10)の前方最端縁部に設置すると共に該多孔性繊維膜(13)と重なり合わせる。表示担体繊維ブロック(12)は、サンプル吸水パッド(11)の下方であって、該多孔性繊維膜(13)上に重なり合うように設置される。該表示担体繊維ブロック(12)は、青色の表示担体を浸透させ、且つ該担体上に固定化された抗体または抗原を保持する。

【0026】ベースプレート上の抗グリコシル化蛋白質抗体およびグリコシル化抗原(例えば、最終グリコシル化生成物(AGEs)抗原)との反応生成物の如き免疫複合体の形成に伴ない対照線に対して色の変化が生ずる。

【0027】判定領域部(14)(線または点)は、その上に抗体または抗原が固定され、多孔性繊維膜(13)の表面上の一部に位置する。判定領域部(14)の前端が表示担体繊維ブロック(12)に対向し、後方には適宜な距離において対照領域部(15)(線または点)を設ける。該対照領域部(15)は、また、多孔性繊維膜(13)上の一部に設置され、その上には固定化した抗体または抗原を有する。また、対象領域部15は、その後端部が吸収パッド(16)に対向する。該多孔性繊維フィルム(13)の材質は、ナイロン繊維膜、硝酸セルロース膜、ポリエステル繊維膜、セルロース繊維膜、合成繊維膜等から選択される。

【0028】図2を参照すると、テストストリップ(10)を内設した防水装置ボックス(20)にはサンプリングホール(21)と反応領域ホール(22)が設けられている。

【0029】図3は、テストストリップ(10)を内設

した防水装置ボックス(20)の断面図である。図面に依れば、サンプル吸水パッド(11)はサンプリングホール(21)の下方に位置し、且つサンプリングホール(21)内に露出する。またサンプリングホール(21)の面積はサンプル吸水パッド(11)よりも小さくする。判定領域部(14)と、対照領域部(15)とは、互いに接触することなく反応領域ホール(22)内に設けられ、肉眼で直接観察することができる。吸収パッド(16)は、防水装置ボックス(20)内の後部端縁部に設けられる。表示担体繊維ブロック(12)上の青色表示担体は、その上に固定化された抗体または抗原を保持しているため、表示担体繊維ブロック(12)上の青色表示担体が測定サンプルに接触すると、該青色表示担体はテストストリップ(10)上において多孔製繊維フィルム(13)および吸収パッド(16)の方向に向かって自由に移動する。ベースプレート(17)は、防水装置ボックス(20)内部の底面と接触し、またベースプレート(17)の上には多孔性繊維フィルム(13)を設ける。該多孔性繊維膜(13)上には判定領域部(14)と、対照領域部(15)とが形成され、その空隙は阻害蛋白質によって完全に被覆される。

【0030】サンプリングホール(21)に被測定物を含む測定液体サンプルを投入すると、該被測定サンプルは、表示担体繊維ブロック(12)上の青色表示担体に固定化された抗体または抗原と即時に反応するのみならず、青色表示担体と共に吸収パッド(16)に向かって移動する。被測定サンプルに例えばAGE抗原などのグリコシル化蛋白質抗原が含まれる場合、青色表示担体上に固定化された一種または二種以上の抗グリコシル化蛋白質抗体と即時反応し、グリコシル化蛋白質抗体のすべての抗原結合部分を占める。即ち、青色表示担体上に固定化された一種または二種以上の抗グリコシル化蛋白質抗体の結合部分を占め、グリコシル化蛋白質抗原(例えばAGE抗原)と完全に結合し、かつ占めるため、判定領域部(14)上に固定化された一種または二種以上の抗グリコシル化蛋白質抗原と結合することができず、青色表示担体は判定領域部(14)を完全に通過しても、線上に目で確認できる青色の線を形成しない。青色表示担体は引き続いて移動し、対照領域部(15)上に固定化された抗体または抗原(例えば、抗マウス免疫グロブリンG抗体)と結合して、肉眼で確認できる青色の線を形成する。従って、判定領域部(14)上の青色の線が出現しない場合は、陽性反応を意味し、対象領域部(15)には陽性であろうと陰性であろうと、いずれも青色の線が出現して品質の自己判断に提供される。一方、被測定サンプルが被測定物を含有しない場合は、青色表示担体上に固定化された一種または二種以上の抗グリコシル化蛋白質抗体の一部が判定領域部(14)上に固定化されたグリコシル化蛋白質抗原、例えばAGE抗原と反応して肉眼で確認できる青色の線を形成する。その他青

色表示担体の一部は、対照領域部（15）上で結合する。これは競合反応法によるものである。従って、判定領域部（14）に青色の線が出現した場合は陰性反応である。吸収パッド（16）は、毛細管作用を発生させ、これを維持して末端に移動する液体を吸収する。

【0031】また、前記の如き場合には、判定領域部（14）に固定化されたグリコシル化蛋白質抗原を一種または二種以上の抗グリコシル化蛋白質抗体に変更すれば、サンドイッチ測定法を行うことができる。

【0032】本発明において用いられる多孔性繊維膜は、孔径が0.1μ～60μmの範囲にある。また、本発明における表示担体は着色微粒子、蛍光物質または酵素から選択される。該着色微粒子は粒径が0.01μ～20μmの範囲にある。本発明における微粒子顆粒とは、ラテックス微粒子、染料微粒子、リボソーム、コロイド状金微粒子、カーボンブラック微粒子または重合体微粒子などである。本発明における表示担体が着色微粒子である場合は、直接判定することができるので、直接表示担体と称する。また、本発明における表示担体が酵素である場合、色表示剤による反応を介して結果を判定するので、間接表示担体と称する。

【0033】また、本発明におけるベースプレートは、防水性を具えるプラスチック材料かまたは防水紙などの材質のものでよい。さらに、本発明における表示担体繊維ブロックは、一種の非水溶性の繊維からなるものである。

【0034】

【実施例】本発明について下記の実施例によりさらに詳しく説明する。ただし、実施例は本発明を限定するものではない。

【0035】**実施例1**

抗グリコシル化蛋白質抗体の作製

グリコシル化蛋白質の抗体は、精製した抗原、例えばAGE抗原で兔または山羊を直接免疫させることによりポ

結果：

	表示担体凝集懸濁液
陰性標準血清0単位/ml	—
陰性標準血清1単位/ml	—
陰性標準血清2.5単位/ml	—
弱陽性血清標準血清5単位/ml	+
強陽性標準血清16単位/ml	+
未測定の被測定サンプル	+

【0040】凝集反応は、AGE抗原試験に陽性反応が発生したことを表す。一方、凝集反応が発生しない場合は、AGE抗原試験に陰性反応が発生したことを表す。最低陽性反応値を5単位/mlに設定して、未測定の被測定サンプルに陽性反応が現れた場合、該被測定サン

\*リクローナル抗体として、またはマウスの免疫によりハイブドーマを作製し、さらに、モノクローナル抗体として作製される。

【0036】**実施例2**

グリコシル化蛋白質抗原の凝集アッセイ

約0.8μmの粒径のポリスチレン顆粒またはその他の有色の微粒子を表示担体微粒子として使用し、表示担体微粒子を3%の濃度に希釈した。実施例1において得られたAGE抗体（抗最終グリコシル化蛋白質抗体）を燐酸緩衝液で2mg/mlに希釈した。表示担体微粒子懸濁液と抗体溶液をそれぞれ10mlずつ採取してガラス管内で混合し、8時間静置した。さらに1gのウシ血清アルブミン（BSA）を添加してガラス管内で混合した後、さらに8時間静置した。ついで、12,000rpmで30分間の遠心処理を加えて上澄み液を除去し、同様の操作を2回繰り返した。さらに、2%のBSA溶液を添加し、溶液の総量を20mlとした。ついで、得られた混合物に音波処理を施して表示担体懸濁液として均一な懸濁液を得た。

【0037】AGE抗原（最終グリコシル化蛋白質抗原）の含有量がそれぞれ0単位/ml、1単位/ml、2.5単位/mlの陰性標準血清溶液3本と、AGE抗原の含有量が5単位/mlの弱陽性標準血清1本と、AGE抗原の含有量が16単位/mlの強陽性標準血清1本と、未測定の被測定サンプル1本とを用意した。

【0038】前記の如くして調製した血清溶液をそれぞれ100マイクロリットルを比色試験管に採取して被測定サンプルを充填した測定デバイスに添加した。次いで、それぞれの測定デバイスに50マイクロリットルの表示担体懸濁液を加え、塗り広げて3から5分間経過後、肉眼で結果を判定した。

【0039】

【表1】

ル内に含まれるAGE抗原の濃度が5単位/mlであることを示す。

【0041】**実施例3**

グリコシル化蛋白質抗原の免疫比濁分析アッセイ

表示担体微粒子0.2gを1リットルの蒸留水に添加し

て懸濁液を作成した。表示担体は約0.3 μmの粒径を有する白色ポリスチレン顆粒でよく、または、その他異なる波長の下において異なる色を呈する微粒子も使用することができる。この懸濁液に30 mgの抗A T G抗体を添加し、十分混合した後18時間静置した。次いで混合物は12,000 rpmで30分間遠心処理を行って上澄み液を除去した。この手順を3回繰り返した。さらに2% B S A溶液を加え、総量を1リットルにした。得られた混合物に音波処理を施して表示担体懸濁液として均一な懸濁液を得た。

【0042】A G E 抗原の含有量がそれぞれ0単位/ml、1単位/ml、2単位/ml、4単位/ml、6単位/ml、16単位/mlの標準血清溶液6本と、未測定の被測定サンプル1本とを用意した。

【0043】250マイクロリットルの表示担体懸濁液をそれぞれ比色試験管に添加した。前記の如くして調製した標準血清溶液をそれぞれ20マイクロリットル採取して異なる比色試験管にそれぞれ投入した。さらに20マイクロリットルの未測定の被測定サンプルを別の比色\*

結果：

	0秒OD値	240秒OD値	反応OD値	単位
標準血清A	0.86	0.85	0.01	0
標準血清B	0.92	0.87	0.05	1
標準血清C	0.98	0.82	0.16	2
標準血清D	1.02	0.83	0.19	4
標準血清E	0.94	0.69	0.26	8
標準血清F	0.99	0.69	0.3	16
未測定の被測定サンプルG	1.07	0.81	0.26	9

【0047】本実施例によれば、陰性標準血清溶液0単位/mlと、陽性標準血清溶液5単位/mlにより定性測定を行うことができる。未測定の被測定サンプルの反応OD値が、陽性標準血清5単位/mlの反応OD値に比較的高い場合、陽性反応であることが示され、一方、逆の結果であれば陰性反応である。

#### 【0048】実施例4

免疫テストストリップによるグリコシル化蛋白質抗原のアクセイ

約0.3 μの粒径を有するポリスチレン顆粒または他の着色微粒子を用いて、青色表示担体微粒子の3%懸濁液を調製した。また、抗-A G E抗体を燐酸緩衝液で2 mg/mlの濃度に希釈した。各溶液をそれぞれ10 mlガラス管内に採取し、よく混合した後8時間静置した。さらに1 gのB A Sを加えてよく混合し8時間静置した。次いで、混合物を12,000 rpmで30分間遠心処理し上澄み液を除去した。この手順を2回繰り返

\*試験管に添加した。

【0044】比色分析装置を340 nmの波長で空気リセットし、それぞれ20マイクロリットルの標準血清溶液および未測定の被測定サンプルを比色試験管に添加し、即刻それぞれの比色試験管のOD値(光吸収値)を測定するとともに、240秒を経過した時点において、再度OD値(光吸収値)を測定した。該反応のOD値差は、第2回目の測定値から第1回目の測定を差し引くことにより得た。

10 【0045】陽性反応値を5単位/mlとし、それぞれの標準血清溶液から得られた各反応OD値を標準曲線としてプロットした。それぞれの標準血清に基づいて描かれた標準曲線に基づいて未測定の被測定サンプルのA G E 抗原の濃度を計算することができる。未測定の被測定サンプルの測定値は約9単位/mlで陽性反応を呈した。

【0046】

【表2】

た。総量が20 mlになるまで2%のB S Aと、10%のスクロース溶液を加えた。音波処置を施し、表示担体懸濁液として均一な懸濁液を得た。

40 【0049】幅0.4 cm、長さ15 cmの表示担体繊維ブロックストリップをスクロース含有量10%の表示担体懸濁液に浸し、取り出した後デシケータ中、室温で乾燥させた。乾燥後、さらに冷凍乾燥機に入れて2時間乾燥させて、乾燥剤を有する密封袋に入れて4 以下で保存した。あらかじめ定めた所量の表示担体懸濁液をサンプル吸水パッド上に直接置くかまたは多孔性繊維膜の最前端縁に置いた。但し、後者は大量生産には向かない。

50 【0050】長さ15 cm、幅4.5 cmの硝酸セルロースフィルムの端縁部から1.8 cmの位置に抗-A G E s 抗体(Anti-AGEs Ab)溶液を吹き付けて塗布し固定化した。この吹き付け塗布した線を判定領域部として引用する。さらに、抗兔IgG(Anti-rabbit IgG)を含む溶



液を、該判定領域部から3.4cm離れた位置に吹き付けて塗布し固定化した。この吹き付けて塗布した線を対照線として引用する。さらに5%BASを含む燐酸緩衝液溶液に該硝酸セルロースフィルムを少なくとも2時間浸す。次いで該硝酸セルロースフィルムを取り出し、水洗いし、デシケーター内に入れて室温で乾燥させた。その後フィルムはプラスチック材によるベースプレートに貼着した。この場合、ベースプレートの端縁部から2cmの箇所から、ベースプレートの長手方向に沿って、ベースプレートを完全に被覆するように貼着した。フィルムはさらに冷凍乾燥機に入れて2時間乾燥した後、乾燥剤を有する密封袋に入れた4で保存した。長さ15cm、幅3cmのサンプル吸水パッドを用意した。該サンプル吸水パッドまたは吸水パッドの材質は特に限定しないが、吸水性が高ければ高いほどよい。また、サンプル吸水パッドのサイズは可変的なものである。

【0051】表示担体繊維ブロックを多孔性繊維膜の前端縁部とベースプレートとの間に、該表示担体繊維ブロックが硝酸セルロースフィルムと互いに重ね合うように設置した。また、サンプル吸水パッドを該表示担体繊維ブロックとベースプレート上に、表示担体繊維ブロックと重ね合うように貼着して被覆した。更に吸水パッドを多孔性繊維膜の完成品の末端であり、ベースプレートの末端に当たる位置に貼着した。吸水パッドは少なくとも面積の一部が繊維膜と互いに重なりあった。これらを幅0.5cmに裁断してテストストリップの完成品を得た。

【0052】該テストストリップ完成品は、該装置ボックスのサンプリングホールが該サンプル吸水パッドの上に位置し互いに接触するように防水装置ボックス内に設けた。また、サンプリングホールの面積は、サンプル吸水パッドよりも狭くする。さらに該テストストリップの判定エリアおよび対照線は装置ボックスの反応領域部内の肉眼で確認できる位置に設置する。

【0053】サンプル吸水パッドは判定領域部の前方に設置した。表示担体繊維ブロックは硝酸セルロースフィルムおよびサンプル吸水パッドとは互いに重なり合わせた。該判定領域部の後方は対象線であり、対照線の更に後方が吸水パッドである。被測定サンプルを投入すると約5分後に反応領域内に肉眼で判定結果が直接確認できる。

【0054】150マイクロリットルの陰性液体血清サンプルを該サンプリングホールに加えると、青色の表示担体は毛細管の原理によって反応線(判定領域部と対照線)に向かって移動し、最後に吸水パッドの後端縁部に到達した。該陰性のサンプルはAGEs抗原を含まないので、該青色表示担体上に固定化された抗-AGE抗体は、判定領域部に固定化された抗-AGE抗体と反応することができず、肉眼で確認できる青色の線を形成しない。該青色の表示担体が対照線上に固定化された抗IgG抗体と結合して肉眼で確認できる青色の線を形成した

\*場合は陰性反応である。吸水パッドは毛細管反応を持続できるように移動する全ての液体を吸収する。

【0055】150マイクロリットルの陽性血清サンプルをサンプリングホールに加えると、青色表示担体が判定領域部に到る前に該表示担体上に固定化された抗-AGEs抗体が血清サンプル内のAGEs抗原と結合した。該青色表示担体が判定領域部に到ると、該判定領域部上に固定化された抗-AGEs抗体が再びAGEs抗原と結合し、肉眼で確認できる青色の線を形成した。余剰の青色表示担体は、判定領域部を通過して対照線上において結合した。これはサンドイッチ法陽性反応を示した。

【0056】当然のことながら、テストストリップの完成品を直接取り出して、サンプルパッドの前端部を被測定サンプルと所定の時間だけ反応させても、上述の実験結果を得ることができる。

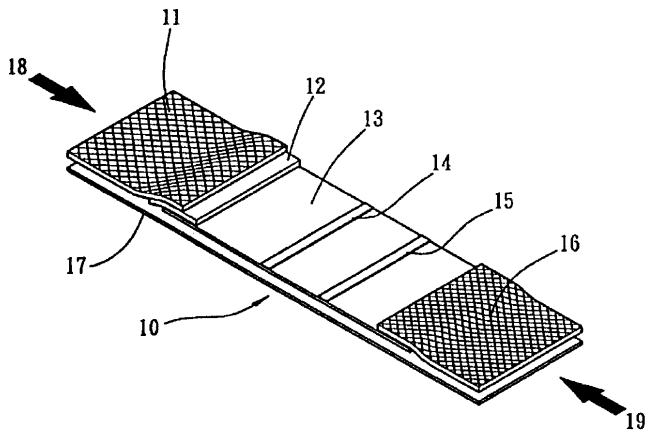
【0057】前記の如く、サンドイッチ法を利用して測定を行う以外に競合法を利用して前記測定を行うことができる。この場合実施例4の手順に従えば判定領域部上に固定化された物質、例えばAGE蛋白質抗原を変更することのみで競争法により実験を行うことができる。

【0058】  
【発明の効果】以上をまとめると、本発明による特定の試薬および方法によって測定すると、糖尿病のAGEが存在するか否かを、医療関係者、看護者が早い時期に知ることができ糖尿病の併発症状発生を予防し、併発症状の継続的な進行を防止することができる。

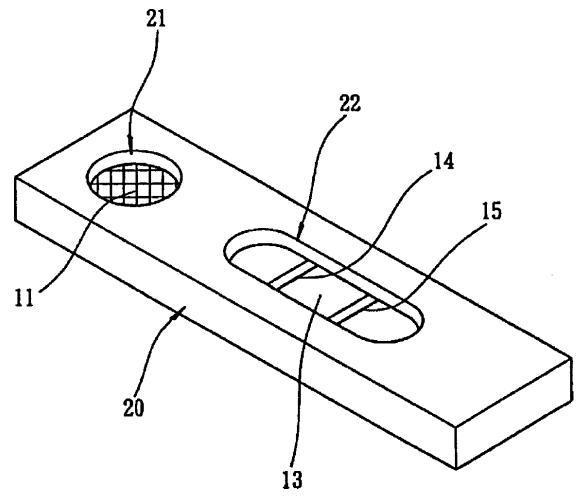
【図面の簡単な説明】  
【図1】本発明による免疫クロマトグラフィーテストストリップの斜視図である。  
【図2】図1に開示する免疫クロマトグラフィーテストストリップを内設する防水装置ボックスの斜視図である。  
【図3】本発明による免疫クロマトグラフィーテストストリップを内設した防水装置ボックスの断面図である。

- 【符号の説明】
- 10 テストストリップ
  - 11 吸水パッド
  - 12 表示担体繊維ブロック
  - 13 多孔性繊維膜
  - 14 判定領域部
  - 15 対照領域部
  - 16 吸収パッド
  - 17 ベースプレート
  - 18 テストストリップの前端
  - 19 テストストリップの後端
  - 20 防水装置ボックス
  - 21 サンプリングホール
  - 22 反応領域ホール

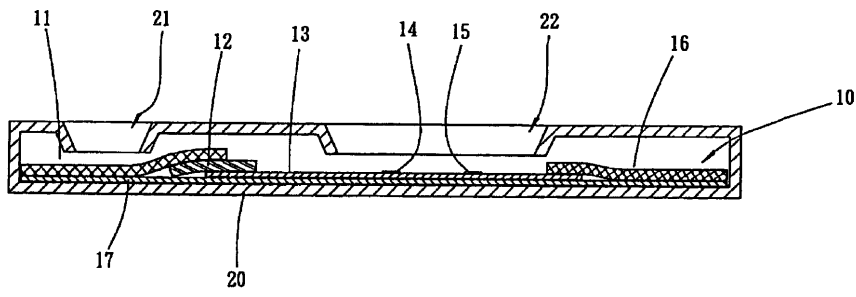
【図1】



【図2】



【図3】



## 【外国語明細書】

***I. TITLE OF THE INVENTION******IMMUNOLOGICAL ANALYTICAL METHOD AND DEVICE FOR  
THE DETERMINATION OF GLYCOSYLATED PROTEIN******II. CLAIMS***

1. A reagent for determining a glycosylated protein, which comprising:  
a displaying carrier suspension; and  
a affinity substance immobilized on said displaying carrier suspension;  
wherein, after contacting a test sample with said reagent, the presence or not of  
the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody in said  
test sample can be determined based on the occurrence or not of an  
agglutination phenomenon.
2. The reagent as in claim 1, wherein said displaying carrier is a colored micro-  
particle.
3. The reagent as in claim 1, wherein said displaying carrier has a particle size in  
the range of about 0.01 – 60 micrometer.
4. The reagent as in claim 1, useful for determining a glycosylated protein  
antigen or an anti-glycosylated protein antibody.
5. The reagent as in claim 1, wherein said affinity substance is a glycosylated  
protein antigen.
6. The reagent as in claim 1, wherein said affinity substance is a glycosylated  
protein antigen having various structures.
7. The reagent as in claim 1, wherein said affinity substance is an anti-  
glycosylated protein antibody.
8. The reagent as in claim 1, wherein said affinity substance is a multiple anti-  
glycosylated protein antibody.
9. The reagent as in claim 1, which determines a glycosylated protein antigen or

- an anti-glycosylated protein antibody through a competitive method.
10. The reagent as in claim 1, which determines a glycosylated protein antigen or an anti-glycosylated protein antibody through a sandwich method.
  11. A reagent for determining a glycosylated protein, which comprising:
    - a displaying carrier suspension; and
    - a affinity substance immobilized on said displaying carrier suspension;wherein, after contacting a test sample with said reagent and measuring the absorbance, the presence or not of the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody in said test sample can be determined based on the change or not of the absorbance.
  12. The reagent as in claim 11, wherein said displaying carrier is a colored micro-particle or an enzyme.
  13. The reagent as in claim 11, wherein said micro-particle is a micro-particle selected from the group consisting of latex micro-particle, liposome, dye micro-particle, polyethylene glycol micro-particle, NADH micro-particle, NAD micro-particle, polymeric micro-particle or carbon micro-particle.
  14. The reagent as in claim 11, wherein said absorbance of said displaying carrier is measured at a wavelength in the range of 260 nm to 840 nm.
  15. The reagent as in claim 11, wherein said displaying carrier has a particle size in the range of about 0.001 – 20 micrometer.
  16. The reagent as in claim 11, wherein said affinity substance is a glycosylated protein antigen.
  17. The reagent as in claim 11, wherein said affinity substance is a glycosylated protein antigen having various structures.
  18. The reagent as in claim 11, wherein said affinity substance is an anti-glycosylated protein antibody.
  19. The reagent as in claim 11, wherein said affinity substance is a multiple anti-glycosylated protein antibody.

20. The reagent as in claim 11, useful for determining a glycosylated protein antigen or an anti-glycosylated protein antibody.
21. The reagent as in claim 20, wherein said determination is carried out through a competitive method.
22. The reagent as in claim 1, wherein said determination is carried out through a sandwich method.
23. An immunological chromatographic analytical device for determining a glycosylated protein, which device comprising:
  - a test strip, comprising:
    - a base plate; and constitutive parts provided on said base plate, wherein said constitutive parts comprise:
      - (a) a water-absorption pad, provided at the front end of said test strip, with its rear end associated with the front end of a porous fiber membrane in a up and down relationship;
      - (b) a porous fiber membrane, provided on the base plate and having a reading zone thereon provided behind a displaying carrier fiber block;
      - (c) a displaying carrier fiber block, provided between the rear end of the water absorption pad for the sample and the front end of said porous fiber membrane, and being overlapped one another with these two parts; said displaying carrier fiber block having a displaying carrier loaded thereon; and said displaying carrier having displaying carriers immobilized thereon; and
      - (d) at least one immobilized substance, disposed in the reading zone of said porous fiber membrane;
  - wherein, with a test strip constructed with the above-mentioned parts, after adding a test sample onto the water absorption pad for a period of time, the presence or not of the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody in said test sample can be determined based on the occurrence of a

reaction color or not on the reading zone.

24. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein the material of said porous fiber membrane is a nylon fiber membrane, a cellulose nitrate film, a polyester fiber membrane, a cellulose fiber membrane, or a polymeric fiber membrane.
25. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said pore size of said porous fiber membrane is in the range of about 0.1 micrometer to 60 micrometer.
26. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said displaying carrier is a colored micro-particle, an enzyme or a fluorescent substance.
27. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said micro-particle is a micro-particle selected from the group consisting of latex micro-particle, dye micro-particle, gold emulsion micro-particle, carbon black micro-particle, metal micro-particle, liposome, polymeric micro-particle.
28. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said displaying carrier has a particle size in the range of about 0.01 – 20 micrometer.
29. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said affinity substance is a glycosylated protein antigen having one structure.
30. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said affinity substance is a glycosylated protein antigen having various structures.
31. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said affinity substance is an anti-glycosylated protein antibody.
32. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said affinity substance is multiple anti-glycosylated protein antibodies.

33. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said immobilized substance is a glycosylated protein antigen having one structure.
34. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said immobilized substance is a glycosylated protein antigen having various structures.
35. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said immobilized substance is an anti-glycosylated protein antibody.
36. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said immobilized substance is multiple anti-glycosylated protein antibodies.
37. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, useful for determining a glycosylated protein antigen or an anti-glycosylated protein antibody.
38. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said displaying carrier is a direct displaying carrier.
39. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, wherein said displaying carrier is an indirect displaying carrier.
40. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, comprising further a reference zone provided at an appropriate distance from said reading zone of said porous fiber membrane, wherein said reference zone has a antibody or antigen immobilized thereon.
41. The immunological chromatographic analytical device as in claim 23, useful for determining or quantitatively analyzing the result through optical method.
42. A method for determining glycosylated protein, comprising essentially of using a suspension containing a displaying carrier which has an affinity substance immobilized thereon; mixing a test sample with said suspension, and determining whether a glycosylated protein or antibody is present or not based on the occurrence of an agglutination phenomenon in said suspension.

43. The immunological chromatographic analytical method as in claim 42, wherein said affinity substance is an anti-glycosylated protein antibody.
44. The immunological chromatographic analytical method as in claim 42, wherein said affinity substance is a glycosylated protein antigen.
45. A method for determining glycosylated protein, comprising essentially of using a suspension containing a displaying carrier which has an affinity substance immobilized thereon; mixing an appropriate amount of said displaying carrier suspension with a test sample, a positive standard solution and a negative standard solution, respectively, in different colorimetric tubes, measuring on a proper absorbance measuring device the respective change of absorbance and determining the results through turbidimetric method.
46. The immunological chromatographic analytical method as in claim 45, wherein said affinity substance is an anti-glycosylated protein antibody.
47. The immunological chromatographic analytical method as in claim 45, wherein said affinity substance is a glycosylated protein antigen.

### ***III. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION***

#### ***FIELD OF THE INVENTION***

The invention relates to an immunological analytical method, reagents and devices for the determination of the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody, which determine the immunological reaction of the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody by agglutination phenomenon or accompanied changes of absorbance or color.

#### ***PRIOR ART***

The pathogenic mechanism of diabetes has been thoroughly understood today. For example, it is known that, under the situation of hyperglycemia, a protein (e.g.,



albumin) might be glycosylated into glycosylated protein (e.g., Advanced Glycosylated End Products (AGEs)), and this would cause abnormal destruction of cells, particular in a diabetic patient. Further, while the blood sugar level of a diabetic patient can currently be controlled effectively with drugs, the efficient manipulation of complicated condition through earlier prediction is still impossible. Therefore, it has been devoted to develop a specific approach or agent to determine whether the AGE of the diabetes is present or not such that the attending practitioner could prevent the occurrence of the complicated condition in a diabetic patient at the earliest stage, or block the progression of the complicated condition. Among such specific approach or reagent for determining the AGE of the diabetes, the most specific and sensitive one comprises of determining the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody, such as, for example, the advanced glycosylated end products, by immunological analytic techniques. However, no immunological analytic technique for determining the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody is available at present.

#### **PROBLEMS TO BE SOLVED BY THE INVENTION**

Therefore, with an eye toward developing an analytical technique for determining the AGE of the diabetes in view of the circumstances noted above, the object of the invention is to provide an immunological analytical technique or devices for determining the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody.

#### **MEANS FOR SOLVING PROBLEMS**

In view of the forgoing, the inventor of this application has been studied extensively and finally, developed an immunological analytic technique or devices for determining the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein

antibody, which essentially comprise of determining the immunological reaction of the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody by agglutination phenomenon or accompanied changes of absorbance or color, and the invention is thus accomplished.

In one aspect, the invention provides an immunological analytic technique for determining the glycosylated protein antigen (antibody) with the glycosylated protein antibody (antigen), which comprises of determining whether any glycosylated protein antigen or antibody is present or not in the sample based on the agglutination phenomenon or accompanied changes of absorbance or color by immunological analytical technique.

In another aspect, the invention provides an immunological analytical reagent for determining the glycosylated protein antigen (antibody) with the glycosylated protein antibody (antigen), which can determine whether any glycosylated protein antigen or antibody is present or not in the sample based on the agglutination phenomenon due to the formation of the immunological complex between, for example, the anti-glycosylated protein antibody and the glycosylated antigen (e.g., Advanced Glycosylated End Products (AGEs) antigen).

In further another aspect, the invention provides an immunological analytical reagent for determining the glycosylated protein antigen (antibody) with the glycosylated protein antibody (antigen), which can determine whether any glycosylated protein antigen or antibody is present or not in the sample based on the change of absorbance due to the formation of the immunological complex between, for example, the anti-glycosylated protein antibody and the glycosylated

antigen (e.g., Advanced Glycosylated End Products (AGEs) antigen).

In still another aspect, the invention provides an immunological analytical test strip for determining the glycosylated protein antigen (antibody) with the glycosylated protein antibody (antigen), which can determine whether any glycosylated protein antigen or antibody is present or not in the sample based on the color change against the reference line due to the formation of the immunological complex between, for example, the anti-glycosylated protein antibody and the glycosylated antigen (e.g., Advanced Glycosylated End Products (AGEs) antigen) on a base plate.

The features, objectives and advantages of the invention will become apparent from perusal of the following description with reference to the appended figures in which:

Figure 1 is the three-dimensional structural view of the immunological chromatographic test strip according to the invention;

Figure 2 is the three-dimensional outlined view of the box of a waterproof device, which box is used for accommodating the immunological chromatographic test strip shown in Figure 1; and

Figure 3 is the overall exploded schematic view of the box of the waterproof device shown in Figure 2, accommodating the test strip according to the invention.

**MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION**

As described above, the invention relates to the determination of the presence or not of a glycosylated protein, such as the advanced glycosylated end products in a sample to be tested by several immunological analytical techniques. Antibody used in the invention can be those raised immunologically in rabbit or goat with purified antigen (e.g., AGE antigen), or those obtained as hybridoma by immunizing mice (e.g., monoclonal antibody).

Immunological analytical techniques are known in the art. For example, Fujikawa H., and Igarashi, H. (Appl. Envir. Microbiol., 54/10, 2345-2348, 1998) disclosed flash emulsion agglutination reagents formed from high density latex granules for detecting enterotoxin A~E of Staphylococcus. Delanghe, J. R., Chapele, J. P., and Vander schueren, S. C., proposed a colorimetric method for detecting myoglobin (Clin. Chem., 36/9, 1675-1678, 1990). WO 88/08534 (1988) disclosed an immunological analytical device comprising an immunological chromatographic membrane as the medium for determining HCG and LH. US Patent No. 5,236,652 (1993) disclosed an immunological chromatographic technique for determining non-protein antigen.

None of the above-mentioned techniques taught about the immunological analytical technique and device for determining the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody disclosed by the invention.

In one aspect, the invention provides an immunological analytic reagent for determining the glycosylated protein antigen (antibody) with the glycosylated protein antibody (antigen), which comprises of determining whether any glycosylated protein antigen or antibody (e.g., Advanced Glycosylated End Products (AGEs) antigen) is present or not in the sample based on an

immunological agglutination technique, which comprises:

A displaying carrier emulsion, and the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody immobilized on the surface of said displaying carrier; which, after contacting said emulsion reagent with a sample to be tested, can determine whether a glycosylated protein antigen or antibody is present or not based on the resultant agglutination phenomenon.

In one embodiment, one or more glycosylated protein antibody is immobilized on said displaying carrier in the emulsion, and a blocking protein is used to fill fully voids in the carrier. When a test sample containing a given amount of glycosylated protein antigen (e.g., Advanced Glycosylated End Products (AGEs) antigen) mixes and reacts with a displaying carrier emulsion comprising one or more immobilized antibody on the reacting plate, immunological complexes as “displaying carrier-antibody, or multiple antibodies-AGEs-antibody, or multiple antibodies-displaying carrier...etc.”. Such reaction will result into a visible agglutination as a positive response within 3-5 minutes. On the other hand, if no AGE antigen present in the test sample, after mixing with the displaying carrier emulsion comprising one or more immobilized antibody, no agglutination will occur therebetween, and hence is considered as a negative response.

The displaying carrier used in the invention is a fine colored particulate with a particle size of 0.01 – 60 micron. Such particulate may be any of latex micro-particles, dye micro-particles, liposomes, colloidal gold particles, carbon black micro-particles, and the like.

The term “antibody” as used herein refers to one or more of the above-mentioned anti-glycosylated protein antibodies. Immobilization of a glycosylated protein antigen having one structure or a glycosylated protein antigen having various

structures can be used to determine whether any antibody of such glycosylated protein antigen is present in the test sample or not; if no agglutination, it is a negative reaction; on the other hand, agglutination means positive reaction.

In another aspect, the invention provides an immunological analytic reagent for determining the glycosylated protein antigen (glycosylated protein antibody) with the glycosylated protein antibody (glycosylated protein antigen), which comprises of detecting the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody (e.g., Advanced Glycosylated End Products (AGEs) antigen or antibody thereof) based on an immunological turbidimetric technique, which comprises:

A displaying carrier suspension, immobilized on the surface of said displaying carrier with the above-mentioned glycosylated protein antigen or antibody; and

A device for measuring absorbance;

which, after contacting said reagent with a sample to be tested, can determine whether a glycosylated protein antigen or antibody is present or not based on the resultant change or not of absorbance.

In one embodiment, one or more glycosylated protein antibody is immobilized on said displaying carrier in the emulsion, and a blocking protein is used to fill fully voids in the carrier. A negative serum standard, a weak positive serum standard, and a unknown test sample are prepared, respectively. To three colorimetric tubes A1, A2 and A3 are charged each of 250 micro-liter of displaying carrier emulsion containing immobilized one or more antibodies. Then, adds 20 micro-liter of the negative serum standard into the colorimetric tube A1; adds 20 micro-liter of the weak positive serum standard into the colorimetric tube A2; and adds 20 micro-liter of the unknown sample into the colorimetric tube A3. Immediately after the additions are accomplished, the tubes are subjected to turbidity or absorbance

measurement at 340 nm, and recorded the respective optical density (OD) value. At 240 seconds after addition of the sample, the respective OD values are recorded again. The difference by subtracting the first recorded OD values from the second recorded OD values, respectively, is the OD value of the immunological reaction. By comparing three OD differences thus obtained, when the difference of OD value from the unknown sample is greater than that from the weak positive serum standard, it can be considered as a positive response. On the other hand, when the difference of OD value from the unknown sample is less than that from the weak positive serum standard, it can be considered as a negative response. Furthermore, by preparing a series of standard solutions each having a known concentration, such as, for example, 0, 1, 2, 4, 8, and 16 units/ml, the concentration in the test sample can be calculated from the standard curve plotted from data obtained with such standard solutions.

The displaying carrier used herein is a fine particulate or enzyme. Such particulates may be any of latex micro-particles, liposomes, polyethylene glycol micro-particulates, NAD micro-particles, carbon micro-particles, dye micro-particles, enzyme, NADH micro-particles, and the like with a particle size of 0.001 – 20 micron and a spectrophotometric range of 260 nm to 840 nm.

The term “antibody” as used herein refers to one or more of the above-mentioned anti-glycosylated protein antibodies. Immobilization of a glycosylated protein antigen having one structure or a glycosylated protein antigen having various structures can be used to determine whether any antibody of such glycosylated protein antigen is present in the test sample or not. Alternatively, a competitive method can be used to yield a same experimental result. For example, when conducted in the same manner as described above, additionally, a given amount of glycosylated protein antigen or antibody with known concentration can be used together with each of the test sample, the positive standard solution and the

negative standard solution to react respectively the displaying carrier emulsion having the antibody or antigen immobilized thereon, a similar result can be obtained as above.

In still another aspect, the invention provides an immunological analytical test strip for determining the glycosylated protein antigen (antibody) with the glycosylated protein antibody (antigen), which can determine whether any glycosylated protein antigen or antibody (e.g., Advanced Glycosylated End Products (AGEs) antigen or antibody thereof) is present or not in the sample based on the immunological chromatographic technique.

Referring to Figure 1, an immunological chromatographic test strip 10 comprises a porous fiber membrane 13 bonded on a base plate 17. A water absorption pad 11 for the sample is disposed at the most front end of the test strip 10, and is overlapped with the porous fiber membrane 13. A displaying carrier fiber block 12 is provided beneath the water absorption pad 11 for the sample and upon the porous fiber membrane 13 in a manner such that it is overlapped with them. The displaying carrier fiber block 12 has been impregnated with a blue displaying carrier and has an antibody or antigen immobilized thereon.

The color change against the reference line due to the formation of the immunological complex between, for example, the anti-glycosylated protein antibody and the glycosylated antigen (e.g., Advanced Glycosylated End Products (AGEs) antigen) on a base plate. A reading zone 14 which may be a spot or a line and which has antibody or antigen immobilized thereon is disposed on a section of the porous fiber membrane 13. The front end of the reading zone 14 faces the displaying carrier fiber block 12, while at an appropriate distance from its rear end, a reference zone 15 which may be a spot or a line is provided and which is also on



a section of the porous fiber membrane 13 and which has antibody or antigen immobilized thereon. The reference zone 15 has its rear end facing an absorption pad 16. The material used to construct the above-mentioned porous fiber membrane 13 may be nylon fiber membrane, cellulose nitrate membrane, polyester fiber membrane, cellulose fiber membrane, synthetic fiber membrane and the like.

Referring to Figure 2, a waterproof device box 20 for accommodating the immunological test strip 10 is consisted of a sample port 21 and a port of the reaction zone 22.

Figure 3 is a three-dimensional view of the waterproof device box 20 accommodating a test strip 10. Wherein, the water absorption pad for the sample 11 is just below the sample port 21, and contact therewith. The area of the sample port 21 should be less than that of the water absorption pad for the sample 11. The reading zone 14 and the reference zone 15 are disposed within the port of the reaction zone 22, but do not contact therewith for visualizing them directly. The absorption pad 16 is located at the rear end of the device box 20. Since, as described above, the blue displaying carrier on the displaying carrier fiber membrane 12 has antibody or antigen immobilized thereon, upon contacting the the blue displaying carrier on the displaying carrier fiber membrane 12 with the test sample, this blue displaying carrier will migrate freely on the test strip 10 in the direction toward the porous fiber membrane 13 and the absorption pad 16. The base plate 17 is associated on its lower side with the inner bottom side of the device box 20 and its upper side with the porous fiber membrane 13. The porous fiber membrane 13 is provided with a reading zone 14 and a reference zone 15, and has its voids filled fully with a blocking protein.

When a liquid test sample is added at the sample port 21, the test sample will react

immediately with the antibody or antigen immobilized in the blue displaying carrier of the displaying carrier fiber block 12 and will migrate together with the blue displaying carrier toward the absorption pad 16. If a glycosylated protein antigen, e.g., a AGE antigen, is present in the test sample, it will react immediately with one or more antibodies of the glycosylated protein immobilized on the blue displaying carrier and occupy all of the epitope on the antibodies of the glycosylated protein. Since the binding sites of antibodies of the glycosylated protein immobilized on the blue displaying carrier will bind with the glycosylated protein antigen and are occupied thereby, they shall not bind with the one or more glycosylated protein antigen immobilized on the reading zone 14 such that all of the blue displaying carrier should pass the reading zone 14 and no visible blue line should appear on this zone. The blue displaying carrier will migrate further till bind with antibody or antigen (e.g., anti-rat immunoglobulin G antibody) immobilized on the reference zone 15 to form a visible blue line. Therefore, a blue line on the reading zone 14 means a positive reaction, while a blue line will appear on the reference zone 15 in all cases disregarding a positive or negative reaction. On the other hand, if the test sample contains no target analyte, a portion of the one or more antibody against the glycosylated protein, will react with the glycosylated protein antigen, e.g., a AGE antigen, immobilized on the reading zone 14 and forms a visible blue line, while other portion of the blue displaying carrier will bind on the reference zone 15, i.e., a competitive reaction. Therefore, a blue line on the reading zone means a negative reaction. The absorption pad 16 is used for absorbing all of the liquid migrating to the end such that a capillary action can be sustained.

Alternatively, in the case as described above, a sandwich assay can be conducted just by replacing the glycosylated protein antigen immobilized on the reading zone 14 with one or more anti-glycosylated protein antibody.

The porous fiber membrane used in the invention has a pore size in the range of 0.1 – 60 micrometer. The displaying carrier used herein is a fine colored particulate, fluorescent substance or enzyme. Such particulates may have a particle size of 0.01 – 20 micron and may be any of latex micro-particles, dye micro-particles, liposomes, colloidal gold particles, carbon black micro-particles, polymeric micro-particles. When the displaying carrier is a fine colored micro-particle, the detecting result can be read directly and is referred as a direct displaying carrier. When the displaying carrier is an enzyme, the result can be read only after developing with a developing agent, and such displaying carrier is referred as indirect displaying carrier.

The base plate used in the invention is a waterproof plastic plate or waterproof paper. The materials used to construct the water absorption pad for the sample and the absorption pad used in the invention is not particularly limited, but it is better to have higher water absorbability. The displaying carrier fiber block is a water insoluble fibrous material.

### ***EXAMPLES***

The invention will be illustrated further more detailed with the following non-limiting examples.

#### **Example 1**

Raising of the antibody of the glycosylated protein

The antibody of the glycosylated protein is prepared as a polyclonal antibody by immunizing directly a rabbit or a goat with purified antigen, e.g., AGE antigen, or by immunizing mice into hybridoma and further manipulating to yield as a

monoclonal antibody.

### **Example 2**

The agglutination assay of the glycosylated protein antigen

A polystyrene bead or other colored micro-particles having a particle size of about 0.8 micrometer was used as the displaying carrier micro-particle and was diluted into a concentration of 3%. The AGE antibody obtained in Example 1 above was diluted with a phosphate buffer into a concentration of 2 mg/ml. 10 ml each of the displaying carrier micro-particle suspension and the antibody solution were added into a glass tube and mixed well, which then stood for 8 hours. Thereafter, 1 g of bovine serum albumin (BSA) was added and mixed in the tube, which then stood for 8 hours. After centrifuging at 12000 rpm for 30 minutes, the supernatant was discarded, and repeated this operation once more. 2% BSA solution was added to a total amount of 20 ml. The mixture was sonicated into a homogeneous suspension as the desired displaying carrier suspension.

Three solutions of negative standard serum were prepared as having a AGE antigen content of 0, 1 and 2 units /ml, respectively. A solution of weak positive standard serum was prepared as having a AGE antigen content of 5 units /ml. A solution of strong positive standard serum was prepared as having a AGE antigen content of 16 units /ml. Finally, an unknown test sample was provided.

100 microliter each of the serum solutions prepared above was placed into a test device having the test sample loaded, respectively. 50 microliter of the displaying carrier suspension was added into each test device, and read results after allowing them developing for 3 – 5 minutes.

**Results:**

	The displaying carrier agglutination suspension
Negative standard serum 0 unit/ml	—
Negative standard serum 1 unit/ml	—
Negative standard serum 2.5 unit/ml	—
Weak positive standard serum 5 unit/ml	+
Strong positive standard serum 16 unit/ml	+
Unknown test sample	+

A agglutination reaction means a positive reaction for the AGE antigen test, while no agglutination reaction means a negative reaction for the AGE antigen test. With the minimum positive reaction limit set at 5 unit/ml, the positive reaction of the unknown test sample indicates the concentration of the AGE antigen in this test sample is  $\geq 5$  unit/ml.

**Example 3**

Immunological turbidimetric assay of the glycosylated protein

0.2 g of the displaying carrier micro-particles was added into one liter of distilled water to prepare a suspension. The displaying carrier may be a white polystyrene bead having a particle size of about 0.3 micrometer. Alternatively, micro-particles having color at other wavelength can be employed also. To this suspension, 30 mg of the anti-AGE antibody was added and mixed well, and then stood for 18 hours. Next, 4 g of BSA was added and mixed well, and again stood for 18 hours. The mixture was centrifuged at 12000 rpm for 30 minutes and the resulting supernatant was discarded. This process was repeated three times. 2% BSA solution was added to a total amount of one liter. The mixture was sonicated into a homogeneous suspension as the desired displaying carrier suspension.

Six standard serum solutions were prepared as having a AGE antigen content of 0,

1, 2, 4, 8 and 16 units /ml, respectively. An unknown test sample was provided.

250 microliter of the displaying carrier suspension was added into a respective colorimetric tube. 20 micrometer each of the standard serum solution prepared above was added into each colorimetric tube, respectively. 20 microliter of the unknown test sample solution was added into another colorimetric tube.

The colorimeter was set to null with air at a wavelength of 340 nm. When 20 microliter each of the standard serum solution and unknown test sample were added, the OD value of individual colorimetric tube should read immediately and read again at 240 second thereafter. A OD difference of the reaction was calculated by subtracting the first OD value from the second OD value.

With the positive reaction limit set at  $\geq 5$  unit/ml, each reaction OD value obtained from each standard serum solution was plotted as a standard curve. The concentration of the AGE antigen in the test sample can then be calculated from this standard curve and the resulting value is 9 unit/ml, a positive reaction.

**Results:**

	OD value at 0 sec	OD value at 240 sec	Reaction OD value	Units
Standard serum A	0.86	0.85	0.01	0
Standard serum B	0.92	0.87	0.05	1
Standard serum C	0.98	0.82	0.16	2
Standard serum D	1.02	0.83	0.19	4
Standard serum E	0.94	0.69	0.25	8
Standard serum F	0.99	0.69	0.3	16
Unknown test sample G	1.07	0.81	0.26	9

According to this example, negative serum solution having a concentration of 0 unit/ml and a positive serum solution having a concentration of 5 units/ml can be used to conduct a qualitative determination. If the reaction OD value of the

unknown test sample is higher than the reaction OD value of the positive standard serum of 5 units/ml, a positive reaction is indicated. Otherwise, it is a negative reaction.

#### **Example 4**

Assay of the glycosylated protein antigen with the immunological test strip

A 3% suspension of blue displaying carrier micro-particles, which may be polystyrene beads, or other colored micro-particles having a particle size of about 0.3 micrometer, was prepared. An anti-AGE antibody was diluted with phosphate buffer into a concentration of 2 mg/ml. 10 ml each of these was placed in a glass tube and mixed well, and then stood for 8 hours. 1 g of BAS was then added and mixed well, and then stood for 8 hours. The mixture was centrifuged at 12000 rpm for 30 minutes and the resulting supernatant was discarded. This process was repeated two more. 2% of BSA, and 10% of sucrose solution were added to a total amount of 20 ml. The mixture was sonicated to form a homogeneous suspension as the desired displaying carrier suspension.

A displaying carrier fiber block strip of 0.4 x 4.5 cm was impregnated in this displaying carrier suspension containing 10% sucrose, removed and dried in a desiccators at room temperature. After drying, it was dried in a freeze-dryer for 2 hours and then packed in a sealed bag containing desiccant and stored at 4°C.

A pre-determined amount of the displaying carrier suspension was loaded on the water absorption pad or on the front end of the porous fiber membrane; however, the latter is less favor for mass production.

An anti-AGEs antibody (anti-AGEs Ab) solution was spray-coated and

immobilized on a band at 1.8 cm of a piece of long cellulose nitrate film of 15 x 4.5 cm, which spray-coated line is referred as the reading zone. Then, a solution containing anti-rabbit IgG was spray-coated and immobilized on the band at 3.4 cm, which spray-coated line is referred as the reference line. Thereafter, the cellulose nitrate film was impregnated in a phosphate buffer containing 5% BAS for at least 2 hours. The cellulose nitrate film was removed, rinsed with fresh water, and dried in a desiccator at room temperature. Thereafter, the film was stuck and completely covered a plastic base plate starting from the 2 cm position. The film thus treated was then dried in a freeze-dryer for 2 hours and then stored in a sealed bag containing desiccant at 4°C.

A water absorption pad for the sample of 15 x 3 cm was provided. The material of the water absorption pad for the sample or the water absorption pad is not particularly limited, but it is better for its higher water absorbability, and its dimension is variable.

The carrier fiber block was interposed between the front end of the porous fiber membrane and the base plate in a manner that the carrier fiber block was overlapped with the cellulose nitrate film. Then, the absorption pad for the sample was stuck on the carrier fiber block and the base plate in a manner that it was overlapped with the carrier fiber block. Finally, the absorbing pad was stick over the rear end of the finished porous fiber membrane and on the end of the base plate. At least some area of the absorbing pad was overlapped with the fiber membrane. Test strips with a width of 0.5 cm was cut therefrom as the finished product.

The finished test strip was installed in a waterproof device box in a manner that the sample port of this device box is at a position just above the water absorption pad for the sample, and contact therewith. The area of the sample port should be less



than that of the water absorption pad for the sample. While the reading zone and the reference zone on the test strip should be in a visible position within the reaction zone of the device box.

The water absorption pad for the sample is disposed in front of the reading zone. The displaying carrier fiber block was overlapped one another with the cellulose nitrate and the water absorption pad for the sample. The reference line was behind the reading zone and the water absorption pad was behind the reference line. At 5 minutes after adding the test sample, the result can be read directly with the eye viewing through the reaction zone.

150 microliter of the negative serum sample was added in the sample port, the blue displaying carrier will migrate toward the reaction line (the reading zone and the reference line) through the capillary principle, and reached finally the water absorption pad at the last end. Since this negative sample did not contain the AGEs antigen, the anti-AGE antibody immobilized on the blue displaying carrier would not react with the the anti-AGE antibody immobilized on the reading zone and hence no visible blue line would form thereon. The blue displaying carrier would bind with the anti-rabbit IgG antibody immobilized on the reference line and form a visible blue line, which meant a negative reaction. The absorption pad would absorb all of the liquid migrated thereto such the capillary action could be sustained.

When 150 microliter of a positive serum sample was into the sample port, the anti-AGEs antibody immobilized on the blue displaying carrier would bind with the AGEs antigen contained in the serum sample before the blue displaying carrier reached the reading zone. At the time the blue displaying carrier reached the reading zone, the anti-AGEs antibody immobilized on the reading zone would bind

again with the AGEs antigen and formed a visible blue line. The remaining blue displaying carrier would pass the reading zone, and bind on the reference line, which exhibited a sandwich positive reaction.

Alternatively, by contacting the front section of the finished test strip product with the test sample for a period of time, an experimental result similar to that described above could be obtained thereby.

As described above, other than the sandwich approach, the above experiment can be conducted by a competitive method. According to Example 4, the experiment can be accomplished through a competitive method just changing the substance immobilized on the reading zone, for example, the AGE protein antigen.

#### ***EFFECT OF THE INVENTION***

In conclusion, by testing with the specific reagent and the method according to the invention, the presence or not of the AGE in the diabetes can be readily known so that the practitioner can, at the earliest stage, prevent the progression of the complicated conditions in the diabetic patient or blocking the further progression of the complicated conditions.

#### ***IV. BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS***

Figure 1 ····· The three-dimensional structural view of the immunological chromatographic test strip according to the invention.

Figure 2 ····· The three-dimensional outlined view of the box of a waterproof device, which box is used for accommodating the immunological chromatographic test strip shown in Figure 1.

Figure 3 ····· is the overall exploded schematic view of the box of the waterproof device shown in Figure 2, accommodating the test strip according to the invention.

Description of Symbols:

- 10 Test strip
- 11 Water-absorption pad
- 12 Displaying carrier fiber block
- 13 Porous fiber membrane
- 14 Reading zone
- 15 Reference zone
- 16 Absorption pad
- 17 Base plate
- 18 The front end of the test strip 10
- 19 The rear end of the test strip 10
- 20 Waterproof device box
- 21 Sample port
- 22 Port of the reaction zone

Fig. 1

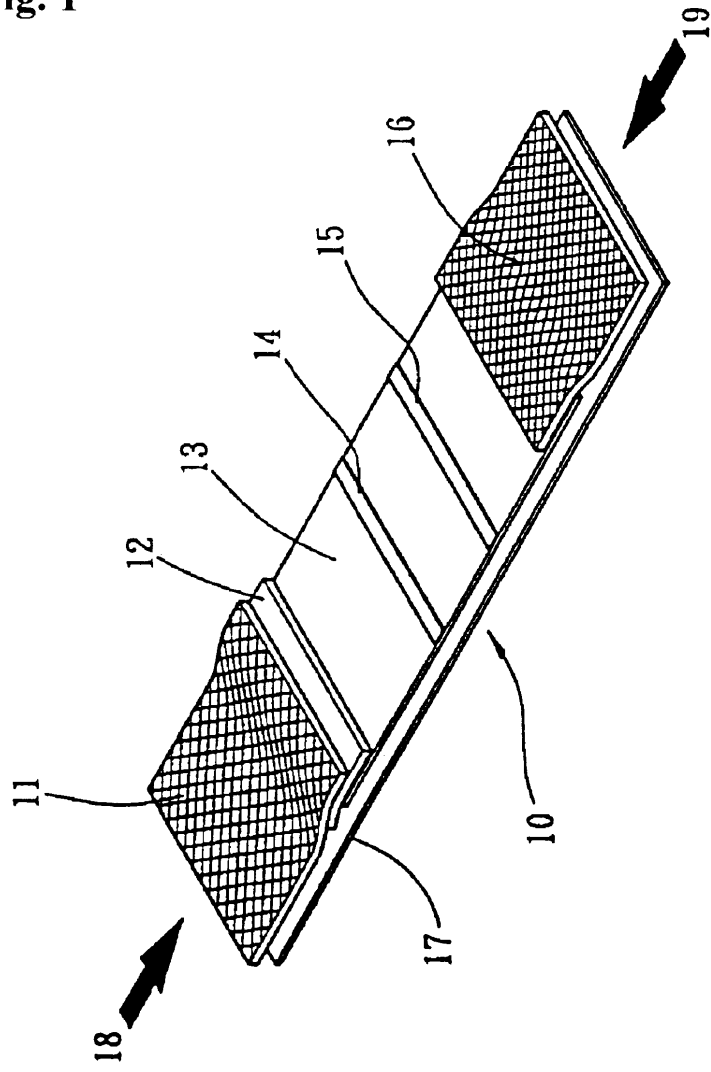


Fig. 2

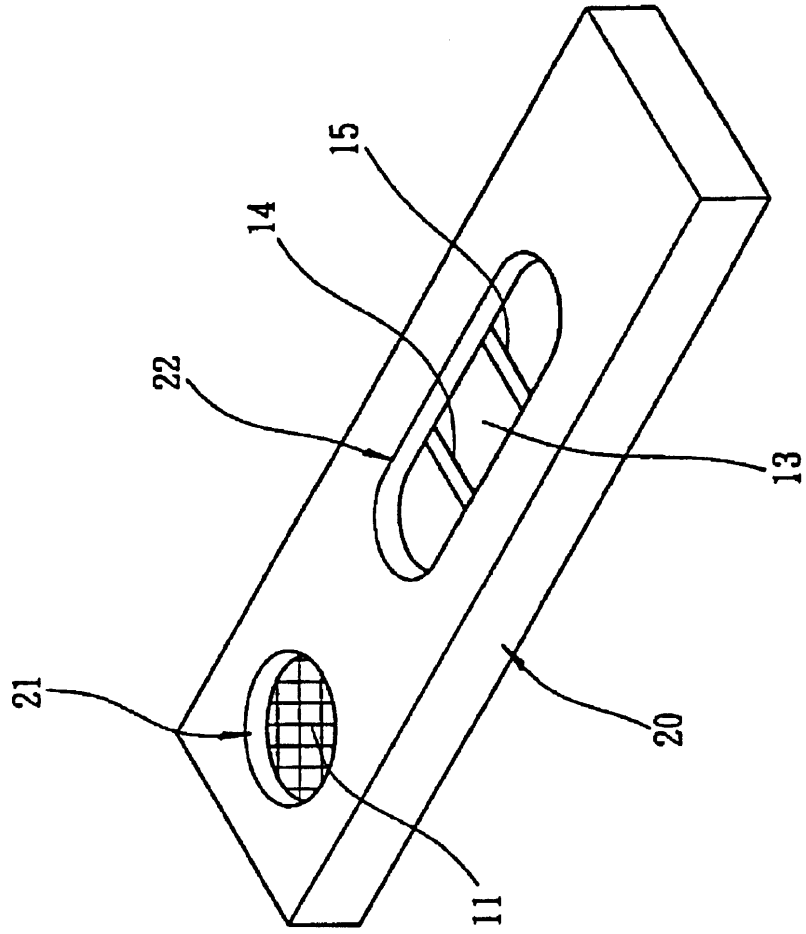
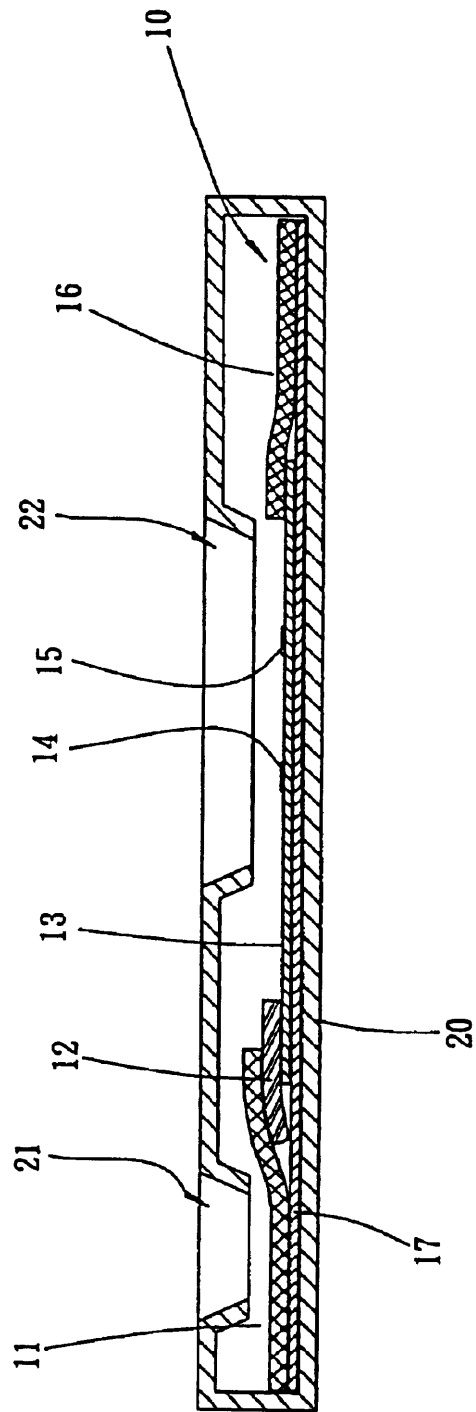


Fig. 3



### ***1. ABSTRACT OF THE DISCLOSURE***

The invention provides an immunological analytical method, reagents and devices for determination the glycosylated protein, e.g., the advance glycosylation end products (AGEs), comprising reagents for determining the glycosylated protein, which comprises a displaying carrier suspension and the antigen or antibody immobilized on the surface of the displaying carrier; and a test strip, comprising of: a base plate, and constitutive parts provided on said base plate, said constitutive parts consisting of a water absorption pad for the sample, a porous fiber membrane, a displaying carrier fiber block and at least one immobilized substance. The immunological reaction of the glycosylated protein antigen or anti-glycosylated protein antibody can be determined based on the agglutination phenomenon or accompanied changes of absorbance or color and the presence or absence of the AGEs in the diabetic patient can be known accordingly such that the practitioner can be prevent the occurrence of the complicated condition, or block further the progression of the complicated conditions.

### ***2. REPRESENTATIVE DRAWING***

*Figure 1*

专利名称(译)	用于糖基化蛋白质的免疫测定的方法和装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003121445A</a>	公开(公告)日	2003-04-23
申请号	JP2001311945	申请日	2001-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	陈咏仪		
申请(专利权)人(译)	刘永详 陈咏仪		
[标]发明人	劉永詳 陳詠儀		
发明人	劉永詳 陳詠儀		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6842		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z G01N33/543.581.A G01N33/53.D G01N33/53.V		
代理人(译)	久保田耕平		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于通过糖基化蛋白质抗体（抗原）测量糖基化蛋白质抗原（抗体）的免疫学分析试剂。解决方案：提供糖基化蛋白质（例如，最终糖基化产物），其试剂及其装置的免疫学分析方法。用于测量糖基化蛋白质的试剂包括显示载体悬浮液和固定在载体上的抗原或抗体，并且测试条10包括基板17和设置在基板上的构成构件。构成部件包含多孔纤维膜13，显示载体纤维块12和一种或多种固定化材料，并且可以通过聚集现象或吸光度变化测量糖基化蛋白质抗原和抗糖基化蛋白质抗体之间的免疫反应或由此产生颜色变化，可以容易地掌握糖尿病患者AGEs的存在。因此，可以在医学领域早期知道糖尿病的最终糖化蛋白质的存在，从而能够采取措施预防糖尿病并抑制并发症的过程。

