



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101008641 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 28

(21) 申请号 200710003682. 1

(22) 申请日 2007. 01. 26

(30) 优先权数据

2006-019895 2006. 01. 27 JP

(73) 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县神户市中央区脇浜海岸通
1 丁目 5 番 1 号

(72) 发明人 辻智悠 吉田步 小国振一郎

(74) 专利代理机构 北京市安伦律师事务所
11339

代理人 刘良勇

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006. 01)

G01N 15/12 (2006. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5094854 A, 1992. 03. 10, 说明书第 3 栏第
36-49 行.

CN 1183559 A, 1998. 06. 03, 说明书第 1 页第
6 段 - 第 7 页最后一段.

EP 0867720 B1, 2002. 07. 10, 说明书第 5 页
第 [0029] 段.

审查员 韩晓洁

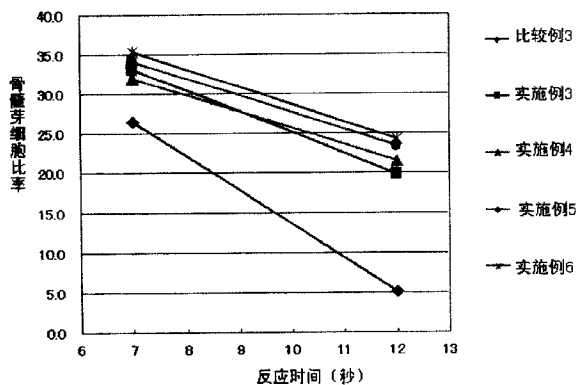
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 15 页

(54) 发明名称

幼稚白细胞分析用试剂及试剂盒

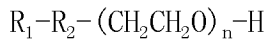
(57) 摘要

本发明提供一种幼稚白细胞分析用试剂及其试剂盒,其能够精确地分析原始粒细胞和幼稚粒细胞等幼稚白细胞和成熟白细胞,且试样的处理条件的允许范围宽于以往。本发明涉及一种幼稚白细胞分析用试剂,其包含破坏试样中红细胞及成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、收缩受损血细胞的增溶剂、糖和对核酸染色的色素。本发明还提供一种幼稚白细胞分析用试剂盒,其包括第一试剂和第二试剂,其中第一试剂含有破坏红细胞及成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、收缩受损血细胞的增溶剂、渗透压调整剂,其渗透压为 150 ~ 600mOsm/kg,电传导度为低于 6ms/cm;以及第二试剂含有对核酸染色的色素。




1. 一种用于分析试样中所含幼稚白细胞的试剂,即幼稚白细胞分析用试剂,其含有:破坏试样中红细胞及成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、收缩受损血细胞的增溶剂、糖和对核酸染色的色素,及浓度小于 3g/L 的氯化钠,其中所述试剂的电传导度为 0.1 ~ 2mS/cm。

2. 如权利要求 1 所述幼稚白细胞分析用试剂,其中所述表面活性剂为有以下结构式 1 的聚氧乙烯型非离子型表面活性剂:



结构式 1

式中, R_1 为碳数是 10 ~ 25 的烷基、链烯基或炔基, R_2 为 $-O-$ 、或 $-COO-$; n 为 10-40。

或 $-COO-$; n 为 10-40。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的幼稚白细胞分析用试剂,其中所述增溶剂选自:肌氨酸衍生物、肌氨酸衍生物的盐、胆酸衍生物和甲基葡糖胺。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的幼稚白细胞分析用试剂,其中所述糖选自:木糖醇、树胶醛糖、葡萄糖、甘露醇、山梨糖醇和核糖醇。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的幼稚白细胞分析用试剂,其中所述糖含量为 10 ~ 75g/l。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的幼稚白细胞分析用试剂,其中所述试剂中不含氯化钠。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的幼稚白细胞分析用试剂,其中试剂的 pH 值为 5.0 ~ 9.0。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的幼稚白细胞分析用试剂,其中试剂的渗透压为 150 ~ 600mOsm/kg。

9. 一种分析试样中所含幼稚白细胞的试剂盒,即幼稚白细胞分析用试剂盒,其包括第一试剂和第二试剂,其中第一试剂含有破坏红细胞及成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、收缩受损伤血细胞的增溶剂、渗透压调整剂,其渗透压为 150 ~ 600mOsm/kg,电传导度为 0.1 ~ 2mS/cm;以及第二试剂含有对核酸染色的色素,其中所述第一试剂含有浓度小于 3g/L 的氯化钠。

10. 如权利要求 9 所述的试剂盒,其中所述渗透压调整剂选自糖和氨基酸。

11. 如权利要求 10 所述的试剂盒,其中所述氨基酸选自氨基乙酸和丙胺酸。

12. 如权利要求 10 所述的试剂盒,其中含有 1 ~ 50g/l 所述氨基酸。

13. 一种分析试样中所含幼稚白细胞的试剂盒,即幼稚白细胞分析用试剂盒,其包括第一试剂和第二试剂,其中第一试剂含有破坏红细胞及成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、收缩受损伤血细胞的增溶剂、糖,以及第二试剂含有对核酸染色的色素,其中所述第一试剂含有浓度小于 3g/L 的氯化钠,且其电传导度为 0.1 ~ 2mS/cm。

幼稚白细胞分析用试剂及试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种试剂及其试剂盒，特别是用于对从生物上收集的试样中所含白细胞进行分类和计数的幼稚白细胞分析用试剂及试剂盒。

背景技术：

[0002] 血细胞在骨髓中制造出来，由未成熟细胞分化、成熟，移动到末梢血。健康人的末梢血液中不会出现幼稚白细胞 (immature leukocyte)，而患有白血病、癌症骨髓转移和重症感染症等病人的末梢血中会出现幼稚白细胞。因此，检查生物试样中的成熟白细胞和幼稚白细胞在诊断上述疾病上是极为重要的。

[0003] 作为测定白细胞的试剂，周知有美国发明专利说明书 5958776 上公开的试剂。此试剂和生物标本混合配制成测定用试样，将此测定用试样装入流式细胞仪 (Flow cytometer)，可根据特定波长光照所得光学信息，将检体分为成熟白细胞和幼稚白细胞，分别计数。还能将幼稚白细胞再细分为原始粒细胞 (myeloblast)、幼稚粒细胞 IG (Immature Granulocyte)，并分别计数。然而，用此试剂处理含有幼稚白细胞的试样时，在某些处理条件下会发生原始粒细胞等幼稚白细胞受损伤，从而降低分选精度。因此，要想用此试剂准确地对试样中的幼稚白细胞进行分选和计数就必须严格控制反应温度和反应时间等处理条件。

发明内容：

[0004] 本发明的范围只由后附权利要求书所规定，在任何程度上都不受这一节发明内容的陈述所限。

[0005] 本发明提供一种用于分析试样中所含幼稚白细胞 (immature leukocyte) 的试剂，即幼稚白细胞分析用试剂，其含有：破坏试样中红细胞及成熟白细胞细胞膜的表面活性剂 (surfactant)、收缩受损血细胞的增溶剂 (solubilizing agent)、糖和对核酸染色的色素。

[0006] 其中所述表面活性剂为有以下结构式 1 的聚氧乙烯型非离子型表面活性剂。

[0007] $R_1-R_2-(CH_2CH_2O)_n-H$

[0008] (式中、R1 为碳数是 10 ~ 25 的烷基、链烯基或炔基，

[0009] R2 为  或 $-COO-$;n 为 10-40。)

[0010] 结构式 1

[0011] 其中所述增溶剂至少选自以下之一：肌氨酸 (sarcosine) 衍生物、肌氨酸衍生物的盐、胆酸 (cholic acid) 衍生物和甲基葡糖酰胺 (methylglucamide) 等。

[0012] 其中所述糖至少选自：木糖醇、树胶醛糖、葡萄糖、甘露醇、山梨糖醇和核糖醇。其中所述糖含量为 10 ~ 75g/l。

[0013] 其中所述试剂中不含氯化钠。其中试剂的 pH 值为 5.0 ~ 9.0。其中试剂的渗透压为 150 ~ 600mOsm/kg。

[0014] 本发明还提供一种分析试样中所含幼稚白细胞的试剂盒,即幼稚白细胞分析用试剂盒,其包括第一试剂和第二试剂,其中第一试剂含有破坏红细胞及成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、收缩受损伤血细胞的增溶剂、渗透压调整剂,其渗透压为 150 ~ 600mOsm/kg,电传导度为低于 6ms/cm;以及第二试剂含有对核酸染色的色素。

[0015] 其中所述第一试剂的渗透压为 3ms/cm 以下。所述渗透压调整剂至少选自糖和氨基酸。其中所述氨基酸至少选自糖胶和丙胺酸中一种。其中含有 1 ~ 50g/l 所述氨基酸。其中所述第一试剂的氯化钠浓度为 3g/l 以下。

[0016] 一种分析试样中所含幼稚白细胞的试剂盒,即幼稚白细胞分析用试剂盒,其包括第一试剂和第二试剂,其中第一试剂含有破坏红细胞及成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、收缩受损伤血细胞的增溶剂、糖,以及第二试剂含有对核酸染色的色素

[0017] 本发明提供的幼稚白细胞分析用试剂及其试剂盒能够精确地分析幼稚白细胞和成熟白细胞,且试样的处理条件的允许范围广于以往。

附图说明:

[0018] 图 1:流式细胞仪。

[0019] 图 2:实施例 1 中的第一二维分布图。

[0020] 图 3:实施例 1 中的第二二维分布图。

[0021] 图 4:实施例 2 中的第一二维分布图。

[0022] 图 5:实施例 2 中的第二二维分布图。

[0023] 图 6:比较例 1 中的第一二维分布图。

[0024] 图 7:比较例 1 中的第二二维分布图。

[0025] 图 8:比较例 2 中的第一二维分布图。

[0026] 图 9:比较例 2 中的第二二维分布图。

[0027] 图 10:实施例 3 ~ 6 和比较例 3 的结果的显示图。

[0028] 图 11:实施例 7 中的第一二维分布图。

[0029] 图 12:实施例 7 中的第二二维分布图。

[0030] 图 13:实施例 8 中的第一二维分布图。

[0031] 图 14:实施例 8 中的第二二维分布图。

[0032] 图 15:实施例 9 中的第一二维分布图。

[0033] 图 16:实施例 9 中的第二二维分布图。

[0034] 符号说明:

[0035] 6:喷嘴;21:光源;22:准直仪透镜;23:流动室;24:聚光镜;25:小孔板;26:前向散射光检测器;27:聚光镜;28:二向色镜;29:侧向散射光检测器;30:小孔板;31:侧向荧光检测器;32:放大器;33:放大器;34:放大器;35:分析器

具体实施方式:

[0036] 使用本实施方式的幼稚白细胞分析用试剂(以下也简称为试剂),可以将试样中所含白细胞分为成熟白细胞和幼稚白细胞,并分别计数。还可以进一步将成熟白细胞细分为淋巴细胞、单核细胞和粒细胞,并分别计数。特别是使用本试剂可以将幼稚白细胞细分为

幼稚粒细胞 IG 和原始粒细胞,并分别非常精确地计数。

[0037] 在本说明书中,所谓幼稚白细胞指普通健康人末梢血中不存在、而存在于骨髓中的未成熟白细胞。比如:指原始粒细胞、前骨髓细胞、骨髓细胞和后骨髓细胞等。前骨髓细胞、骨髓细胞和后骨髓细胞有时也称为幼稚粒细胞 IG。原始粒细胞也包括骨髓系干细胞(CFU-GEMN)、中性粒-巨噬细胞系干细胞(CFU-GMN)、嗜酸性粒细胞系干细胞(CFU-EOS)等白细胞系造血前驱细胞。

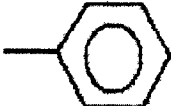
[0038] 作为供测定的生物试样,只要是含白细胞的试样即可,没有特别限定,比如可以是血液、尿液、骨髓穿刺液和通过单采血液成份技术(体外血脂分离术)收集的试样等。

[0039] 本实施方式的试剂包含破坏红细胞和成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、使受破坏血细胞收缩的增溶剂和对核酸染色的色素。将生物试样与试剂混合,凭借表面活性剂的作用,试样中的血细胞细胞膜受损伤。此表面活性剂可以破坏红细胞和成熟白细胞细胞膜,但实质上不会使幼稚白细胞的细胞膜受损。红细胞和成熟白细胞等受损伤的血细胞因增溶剂的作用而收缩。因幼稚白细胞的细胞膜几乎没有损伤,所以与红细胞和成熟白细胞相比,很难因增溶剂而引起细胞的收缩。受损伤的血细胞的核在色素的作用下被染色,而幼稚白细胞几乎不被染色。

[0040] 作为表面活性剂,比如可以用聚氧乙烯型非离子型表面活性剂。具体而言,可以使用有以下结构式 1 的东西。

[0041] $R_1-R_2-(CH_2CH_2O)_n-H$

[0042] (式中、R1 为碳数是 10 ~ 25 的烷基、链烯基或炔基,

[0043] R2 为  或 $-COO-$; n 为 10-40。)

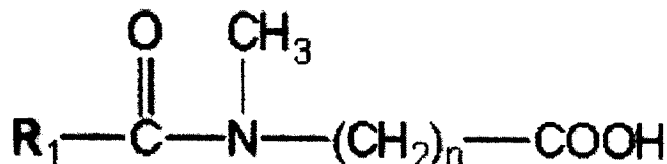
[0044] 结构式 1

[0045] 特别推荐使用聚氧乙烯(16)油酰醚(polyoxyethylene(16)oleyl ether)、聚氧乙烯(20)十二烷醚、聚氧乙烯(15)油酰醚等。

[0046] 试剂中含有的表面活性剂的理想浓度因表面活性剂种类而异,比如使用聚氧乙烯(16)油酰醚的话,1000 ~ 50000ppm 比较合适,10000 ~ 35000ppm 更好。表面活性剂既可以单独使用,也可以二种以上并用。

[0047] 作为增溶剂,比如可以使用肌氨酸(sarcosine)衍生物或其盐、胆酸(cholic acid)衍生物、甲基葡糖酰胺(methylglucamide)等。肌氨酸衍生物有以下结构式:

[0048]

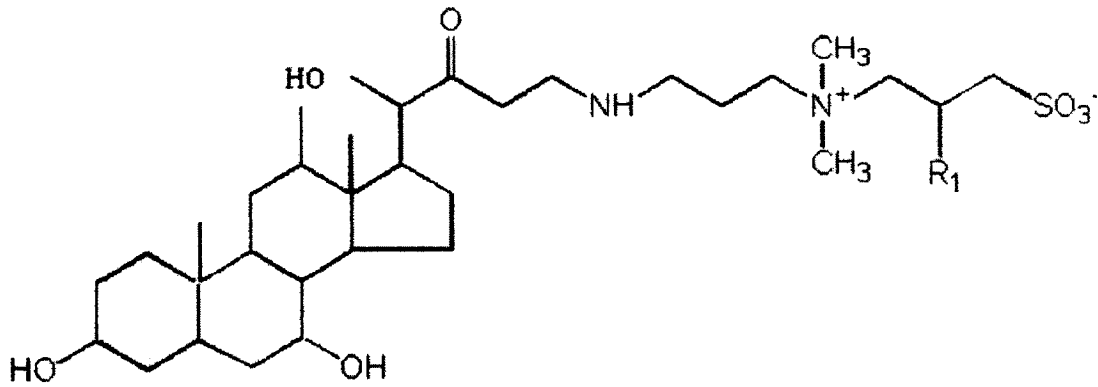


[0049] (式中、R1 为 C10-22 的烷基;n 为 1-5。)

[0050] 结构式 2

[0051] 胆酸衍生物结构式如下:

[0052]

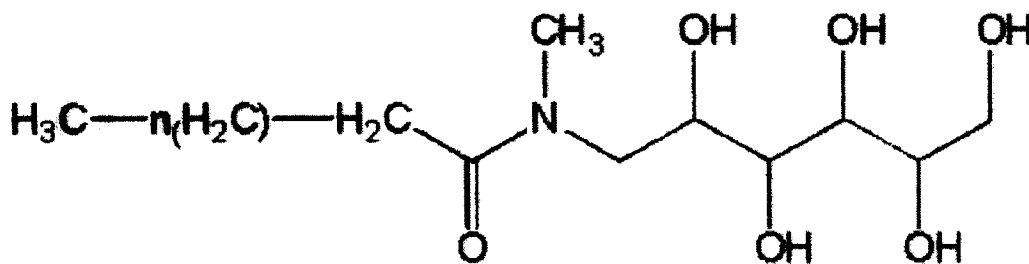


[0053] (式中、R1 为氢原子或羟基)

[0054] 结构式 3

[0055] 甲基葡糖酰胺结构式如下：

[0056]



[0057] (式中、n 为 5-7。)

[0058] 结构式 4

[0059] 使用肌氨酸衍生物或其盐时,试剂中的理想浓度为 200 ~ 3000ppm。使用胆酸衍生物时,则为 100 ~ 10000ppm,使用甲基葡糖酰胺时则为 1000 ~ 8000ppm。

[0060] 就肌氨酸衍生物或其盐具体举例来说,有 N-月桂酰肌氨酸钠盐 (N-Lauroylsarcosine sodium salt)、月桂甲 β -丙氨酸钠、十二烷基肌氨酸等。胆酸衍生物或其盐具体举例有:CHAPS{3-(3-(胆酰氨基丙基)二甲氨基)丙磺酸 (3-[3-(Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]propanesulfonic acid)}、胆汁酸诱导体胶束 CHAPS0(3-(3-(胆酰氨基丙基)二甲氨基)-2-羟基-1-丙磺酸 3-[3-(Chloamidopropyl)dimethyl-ammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate) 等。甲基葡糖酰胺比如有:MEGA8(N-辛酰基-N-甲基葡萄糖)、MEGA9(N-壬酰基-N-甲基葡萄糖)、MEGA10(N-癸酰基-N-甲基葡萄糖)等。

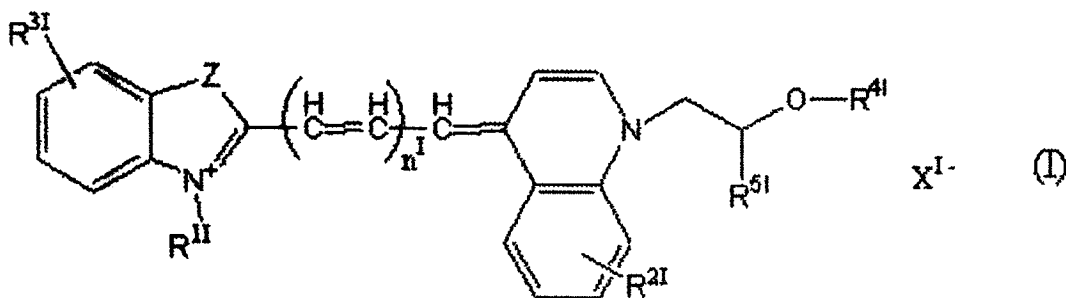
[0061] 此外,作为增溶剂,还可以使用辛基葡萄糖苷(OG)、蔗糖单癸酸酯(Sucrose monocaprato)、N-甲酰甲基亮氨酸丙氨酸(N-formylmethyllleucylalanine)等。使用这些增溶剂时,其在试剂中的浓度为 10 ~ 50000PPM。增溶剂既可单独使用,也可二种以上一起用。

[0062] 作为色素来说,没有特别的限制,只要能够特异性地对核酸染色即可,不过以荧光色素为好。使用这种色素,无核的红细胞几乎不染色,而有核的白细胞却重度染色。根据其染色强度的不同即可辨别红细胞和白细胞。而且,有受损程度足以色素穿透的细胞膜的成熟白细胞被此色素重度染色,而幼稚白细胞几乎不染色。根据此染色强度的不同即可分辨白细胞中的成熟白细胞和幼稚白细胞。色素的种类可根据照射光适当选择。比如使用氩氦

激光和红色半导体激光为光源时,推荐使用有以下结构式的色素。

[0063] 结构式 5

[0064]



[0065] (式中, R^{11} 表示氢原子或低级烷基; R^{21} 和 R^{31} 或相同或不同,表示氢原子、低级烷基或低级烷氧基; R^{41} 表示氢原子、酰基或低级烷基; R^{51} 表示氢原子或可置换的低级烷基; Z 表示硫原子、氧原子或可用低级烷基置换的碳原子; n^1 表示1或2; X^{1-} 表示负离子。)

[0066] 式中 R^{11} 中的低级烷基为碳原子数1~6的正链或支链的烷基。例如:甲基、乙基、丙基、丁基、异丁基、仲丁基(sec-丁基)、叔丁基(ter-丁基)、戊基、己基等,其中以甲基和乙基为最好。

[0067] R^{21} 和 R^{31} 中的低级烷基与上述相同,作为低级烷氧基,意指碳数为1~6的烷氧。比如甲氧基、乙氧基、丙氧基等,其中以甲氧基和乙氧基为好。另外, R^{21} 和 R^{31} 最好是氢原子。

[0068] R^{41} 中的酰基推荐由脂肪族羧酸衍生的酰基。具体而言,有乙酰基和丙酰基等,其中以乙酰基为好。低级烷基也与上述相同。

[0069] R^{51} 中的低级烷基同上述,可置换的低级烷基指可用1~3个羟基、卤原子(氟、氯、溴或碘)等置换的低级烷基。其中,以一个羟基置换的甲基和乙基较为理想。

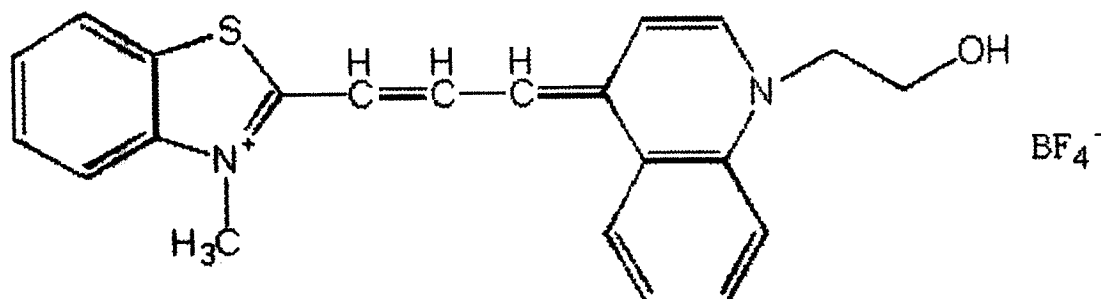
[0070] Z 中的低级烷基同上, Z 最好是硫原子。

[0071] X^{1-} 中的负离子可以是卤负离子(氟、氯、溴或碘)、卤化硼负离子(BF_4^- 、 BCl_4^- 、 BBR_4I^- 等)、磷化合物负离子、卤氧酸盐负离子、氟硫酸负离子、甲基硫酸负离子以及以含有芳香环卤或卤的烷基作为置换基的四苯基硼化合物负离子等。其中优选溴负离子或 BF_4^- 。

[0072] 就上述(I)的色素具体举例来说,推荐以下色素:

[0073] 色素 A

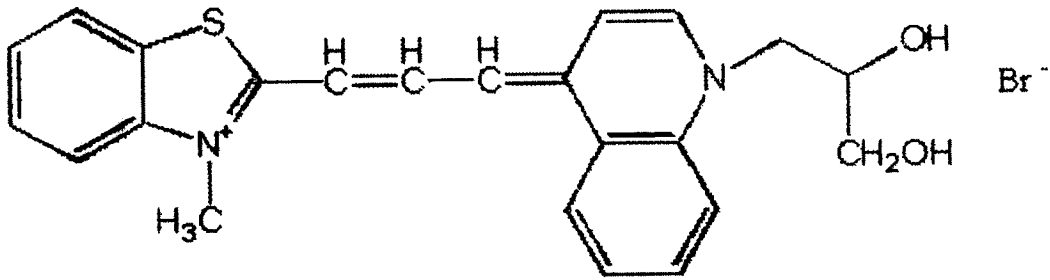
[0074]



[0075] 结构式 6

[0076] 色素 B

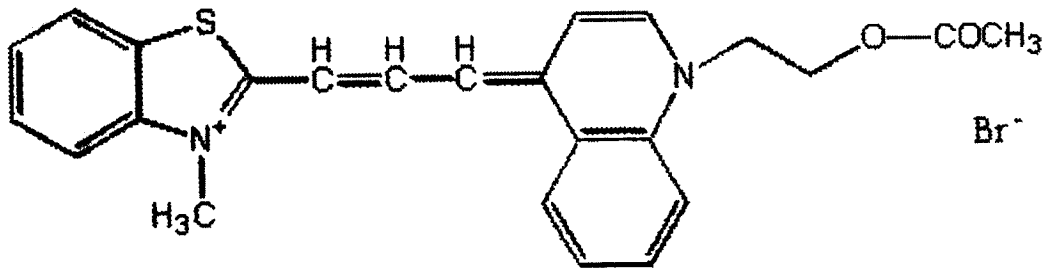
[0077]



[0078] 结构式 7

[0079] 色素 C

[0080]



[0081] 结构式 8

[0082] 除上述色素外,也可适当使用碘化丙锭、溴化乙锭 (EtBr)、乙锭氮蒽杂二聚物、二迭氮乙锭 (ethidium diazide)、乙锭均二聚物—1、乙锭均二聚物—2、一迭氮乙锭 (ethidium monazide)、TOTO—1、TO—PRO—1、TOTO—3、TO—PRO—3、碘绿 (Iodine Green)、NK—3975 (林原生物学研究所)、NK—1570 (林原生物学研究所)、NK—1049 (林原生物学研究所) 等。

[0083] 上述色素在试剂中的浓度可以为 0.01 ~ 500PPM, 优选 0.1 ~ 200PPM。色素可单独使用, 也可二种以上并用。

[0084] 试剂的渗透压最好调整为 150 ~ 600MOsM/KG。为了使试剂的渗透压调整到所期望的范围, 试剂中应含有糖。用糖调整试剂的渗透压可以避免反应时间延长或反应温度过高引起原始粒细胞受损, 从而准确地对原始粒细胞和成熟白细胞进行分类和计数。

[0085] 作为调整渗透压的物质 (渗透压调整剂) 也可以让试剂中含有氯化钠。但是试剂中含有大量氯化钠, 会导致试剂和试样混合后反应时间越长或反应温度越高, 原始粒细胞就越容易受损, 使原始粒细胞的细胞核被色素染色。一旦原始粒细胞被染色, 检测出的荧光强度就会与成熟白细胞的荧光强度等同, 使成熟白细胞与原始粒细胞的分类精度下降。因此, 试剂中的氯化钠浓度以不影响测定为宜, 可以是 0.01 ~ 3G/L, 最好为 0G/L (不含)。

[0086] 试剂中所含糖类没有特别限定, 可以使用单糖类、多糖类、糖醇等。单糖类有葡萄糖、果糖等, 多糖类有树胶醛糖等, 糖醇有木糖醇、山梨醇、甘露醇和核糖醇。试剂中的糖浓度可为 10 ~ 75G/L, 最好是 20 ~ 50G/L。在这些糖中, 可以使用一种, 也可以使用二种以上。

[0087] 为了调整试剂的 PH 值, 最好在试剂中添加缓冲剂。缓冲剂可以用 HEPES 等良好缓冲剂、磷酸缓冲剂等以及苛性钠等 PH 值渗透压调整剂。试剂的 PH 值以 5.0 ~ 9.0 为宜。

[0088] 上述各成份可以放在同一个容器内, 但最好放在二个以上容器内作为试剂盒。此试剂盒包括第一试剂和第二试剂, 其中第一试剂含有破坏红细胞和成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、收缩受损血细胞的增溶剂和糖; 第二试剂含有色素。在这种情况下, 为了提高色

素的保存稳定性,最好将第二试剂的色素溶解在有机溶媒中。

[0089] 本发明的其他实施方式的试剂盒包括含有破坏红细胞和成熟白细胞细胞膜的表面活性剂、收缩受损血细胞的增溶剂和渗透压调整剂的第一试剂和含有核酸染色色素的第二试剂。

[0090] 渗透压调整剂添加的目的是将第一试剂的渗透压和电传导度调整到所期望的值。使用此渗透压调整剂,第一试剂的渗透压将调整到 150 ~ 600MOsM/KG,第一试剂的电传导度将调整到 6MS/cM 以下,优选 0.01 ~ 3MS/cM,最好调整为 0.1 ~ 2MS/cM。

[0091] 渗透压调整剂可以使用糖和氨基酸等。作为氨基酸,可用缬氨酸、脯氨酸、氨基乙酸和丙胺酸等,但推荐使用氨基乙酸和丙胺酸其中的一个或两个并用。氨基酸的浓度以 1 ~ 50G/L 为宜,10 ~ 30G/L 更好。如果试剂中添加氯化钠作为渗透压调整剂的话,如上所述,其在试剂中的浓度以 0.01 ~ 3G/L 为宜,最好为 0G/L,以免影响对原始粒细胞的测定。

[0092] 将含有上述成份的试剂和生物试样混合,制备测定用试样,即可用流式细胞仪对幼稚白细胞进行分析。

[0093] 生物试样和试剂(如果是试剂盒,与所有试剂的混合试剂)混合比例为 1:10 ~ 1:1000。生物试样中的血细胞和试剂的反应条件最好为 3 ~ 15 秒、20 ~ 40℃。反应温度高,则缩短反应时间即可,反应温度低时,则延长反应时间即可。

[0094] 用流式细胞仪测定试样时,用光照射流经流动室的测定用试样中的血细胞,取得散射光和荧光等光学信息,根据这些信息划定血细胞的种类。

[0095] 具体可以使用图 1 所示流式细胞仪。下面根据图 1,举例说明对原始粒细胞的测定。

[0096] 从喷嘴 6 喷出的测定用试样从流动室 23 的锐孔流过。此时,试样中的血细胞呈一列从锐孔通过。光源 21 发出的光透过准直仪透镜 22 射向流经流动室 23 的血细胞,因此产生侧向散射光、侧向荧光和前向散射光。侧向散射光透过聚光镜 27 和二向色镜 28 射入侧向散射光检测器(光电倍增管)29,侧向荧光透过聚光镜 27、二向色镜 28、滤膜、小孔板 30 射入侧向荧光检测器(光电倍增管)31。前向散射光透过聚光镜 24 和小孔板 25,射入前向散射光检测器(光电二极管)26。

[0097] 前向散射光检测器 26 输出的前向散射光信号、侧向散射光检测器 29 输出的侧向散射光信号和侧向荧光检测器 31 的侧向荧光信号分别被放大器 32、放大器 33 和放大器 34 放大,输送到分析器 35。

[0098] 分析器 35 从收到的前向散射光信号、侧向散射光信号和侧向荧光信号计算出前向散射光强度、侧向散射光强度和荧光强度。分析器 35 绘制以前向散射光强度和荧光强度为两个轴的第一二维分布图,在此二维分布图上划定出现试样中的全白细胞的区域(全白细胞区域)。再就出现在全白细胞区域的细胞绘制以侧向散射光强度和荧光强度为二轴的第二二维分布图,在此二维分布图上设定成熟白细胞出现的区域(成熟白细胞区域)、淋巴细胞出现区域(淋巴细胞区域)、单核细胞出现区域(单核细胞区域)和粒细胞出现区域(粒细胞区域)。进而还特别设定原始粒细胞出现区域(原始粒细胞区域)和幼稚粒细胞出现区域(幼稚粒细胞区域)。对出现在原始粒细胞区域的细胞数计数,作为试样中所含原始粒细胞数,对出现在幼稚粒细胞区域的细胞数计数,作为试样中幼稚粒细胞数。另外,原始粒细胞个小、单核,因此前向散射光强度高,侧向散射光强度弱,而且,如上所述几乎不染

色,故荧光强度弱。粒细胞个大且为分叶核,故前向散射光强度和侧向散射光强度弱,而如上所述几乎不染色,荧光强度也很弱。

[0099] 实例:

[0100] (实例 1)

[0101] 制备以下成份的第一试剂 A 和第二试剂。

[0102] < 第一试剂 A >

[0103] 聚氧乙烯 (16) 油酰醚 (日光化学) 20000PPM

[0104] N- 月桂酰肌氨酸钠 500PPM

[0105] 树胶醛糖 39.6G/L

[0106] 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 10MM

[0107] 蒸馏水 1L

[0108] 将上述成份混合,再添加 NaOH,将 PH 调整为 7.0。第一试剂 A 的渗透压为 280MOsM/KG,电传导度为 0.59MS/cM。

[0109] < 第二试剂 >

[0110] 色素 A20PPM,乙二醇 1L。

[0111] 将 980 μ L 第一试剂和 20 μ L 第二试剂与 20 μ L 含有原始粒细胞的血液试样 A 混合,33 $^{\circ}$ C 下反应 7 秒后,用图 1 所示流式细胞仪测定侧向散射光强度、前向散射光强度和荧光强度。光源使用的是红色半导体激光器。

[0112] 以所得侧向散射光强度和荧光强度为轴绘制第一二维分布图,划定全白细胞区域。此图如图 2 所示。对出现在全白细胞区域内的细胞计数作为全白细胞数。

[0113] 对于第一二维分布图中的全白细胞区域内出现的细胞,再以侧向散射光强度和荧光强度为轴,绘制第二二维分布图,将侧向散射光强度小、荧光强度也小的区域划定为原始粒细胞区域。此图如图 3 所示。对出现在原始粒细胞区域内的细胞计数,作为原始粒细胞数。

[0114] 在本实施例中,计算出原始粒细胞对全白细胞数的比率(原始粒细胞比率=原始粒细胞数/全白细胞数 \times 100),原始粒细胞比率为 45.8%。

[0115] (实施例 2)

[0116] 除将试剂与血样 A 在 35 $^{\circ}$ C 反应外,其他均与实施例 1 相同,计算原始粒细胞比率,所得原始粒细胞比率为 42.6%。实施例 2 中绘制的第一二维分布图如图 4 所示,第二二维分布图如图 5 所示。

[0117] (比较例 1)

[0118] 将含聚氧乙烯 (16) 油酰醚 24.0G/L、N- 月桂酰肌氨酸钠 1.5G/L、DL- 甲硫基丁氨酸 20.0G/L、4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 12.0G/L、1N—NaOH0.3G/L、NaCl4.0G/L 和色素 A3.0MG/L 的试剂 1ML 与血样 B33 μ L 混合反应,其他与实施例 1 相同,计算出原始粒细胞比率,所得原始粒细胞比率为 25.1%。

[0119] 另,比较例 1 绘制的第一二维分布图如图 6 所示,第二二维分布图如图 7 所示。此试剂的渗透压为 350MOsM/KG、电传导度为 7.4MS/cM。

[0120] (比较例 2)

[0121] 除试剂和血样 B 在 35 $^{\circ}$ C 反应外,其他与比较例 1 同,计算出原始粒细胞比率,所得

原始粒细胞比率为 7.2%。比较例 2 绘制的第一二维分布图如图 8 所示,第二二维分布图如图 9 所示。

[0122] 从比较例 1 和 2 可以看出,尽管使用的是同一血样,但在 35℃ 下反应时的原始粒细胞比率(比较例 2)比在 33℃ 下反应时的原始粒细胞比率(比较例 1)低得多。这是因为 35℃ 下反应时,应当出现在原始粒细胞区域的原始粒细胞出现在区域外。即,可以认为,使用比较例 1 和 2 制备的试剂,反应温度越高,原始粒细胞稳定性越差,在 7 秒钟的反应时间内原始粒细胞受到破坏。

[0123] 然而,从实施例 1 和 2 可以看出,在 33℃ 下反应时的原始粒细胞比率(实施例 1)与在 35℃ 下反应时的原始粒细胞比率(实施例 2)结果近似。这是因为在实施例中制备的试剂即使在高温下与原始粒细胞反应,实际上也不会破坏原始粒细胞,能够正确计数。即,使用实施例制备的试剂,原始粒细胞对温度的稳定性提高,不易受损。从上述可以断定,使用实施例制备的试剂可以正确地测定试样中的原始粒细胞。

[0124] (实施例 3)

[0125] 第一试剂 B 除了不是用树胶醛糖而是用木糖醇 39.56G/L、聚氧乙烯(16)油酰醚不是 20000PPM 而是 25000PPM、N-月桂酰肌氨酸钠不是 500PPM 而是 750PPM 之外,其他与第一试剂 A 一样制备。第一试剂 B 的渗透压为 280MOsM/KG、电传导度为 0.59MS/cM。

[0126] 除试剂用的不是第一试剂 A 而是第一试剂 B、血样用的不是血样 A 而是血样 C 外,其他与实施例 1 同,计算原始粒细胞比率。除试剂不是第一试剂 A 而是第一试剂 B、血样不是血样 A 而是血样 C、试剂与血样 C 反应不是 7 秒而是 12 秒外,其他与实施例 1 同,计算原始粒细胞比率。

[0127] (实施例 4)

[0128] 第一试剂 C 除含有的不是木糖醇而是树胶醛糖 39.52G/L 外,其他与第一试剂 B 同样制备。第一试剂 C 的渗透压为 280MOsM/KG、电传导度为 0.62MS/cM。

[0129] 除不是使用第一试剂 B 而是第一试剂 C 外,其他与实施例 3 相同,计算出原始粒细胞比率。

[0130] (实施例 5)

[0131] 第一试剂 D 除含有的不是木糖醇而是丙胺酸 23.16G/L 外,其他与第一试剂 B 同样制备。第一试剂 D 的渗透压为 280MOsM/KG、电传导度为 0.61MS/cM。

[0132] 除使用的不是第一试剂 B 而是第一试剂 D 外,其他与实施例 3 相同,计算出原始粒细胞比率。

[0133] (实施例 6)

[0134] 第一试剂 E 除含有的不是木糖醇而是糖胶 19.52G/L 外,其他与第一试剂 B 同样制备。第一试剂 E 的渗透压为 280MOsM/KG、电传导度为 0.63MS/cM。

[0135] 除使用的不是第一试剂 B 而是第一试剂 E 外,其他与实施例 3 相同,计算出原始粒细胞比率。

[0136] (比较例 3)

[0137] 除使用的不是血样 A 而是血样 C 外,其他与比较例 1 一样,计算原始粒细胞比率。另,除血样不是血样 A 而是血样 C、试剂与血样 C 的反应时间不是 7 秒而是 12 秒外,其他与比较例 1 一样,计算原始粒细胞比率。

[0138] 实施例 3 ~ 6 以及比较例 3 的结果如图 10 所示。图 10 显示出试样与试剂反应 12 秒时的原始粒细胞比率比反应 7 秒时的原始粒细胞比率下降多少。

[0139] 从图 10 可以看出,使用比较例 3 的试剂,让试剂与试样反应 12 秒,比反应 7 秒原始粒细胞比率下降 20% 以上。可以认为这是因为反应时间越长,受试剂的影响,原始粒细胞越容易受损。

[0140] 使用实施例 3 ~ 6 其中之一制备的试剂比使用比较例 3 的试剂,原始粒细胞比率下降控制在 10% 左右。即,由于使用实施例 3 ~ 6 的试剂,原始粒细胞的稳定性得以提高,在测定用试样中原始粒细胞不易受损。如上所述,可以判断,使用实施例 3 ~ 6 的试剂,原始粒细胞不易受损,得以正确地测定原始粒细胞。

[0141] (实施例 7)

[0142] 制备含以下成份的第一试剂 F :

[0143] 聚氧乙烯 (16) 油酞醚 25000PPM

[0144] N- 月桂酰肌氨酸钠 750PPM

[0145] 木糖醇 37.0G/L

[0146] HEPES 10MM

[0147] 蒸馏水 1L

[0148] 将上述成份混合,添加 NaOH,使 PH 值调整为 7.0。第一试剂 F 的渗透压为 280MOsM/KG、电传导度为 0.64MS/cm。第二试剂与实施例 1 制备的一样。

[0149] 除使用的不是第一试剂 A 而是第一试剂 F 以及所用血样不是血样 A 而是血样 D 外,其他与实施例 1 同样,计算原始粒细胞比率,所得原始粒细胞比率 45%。实施例 7 绘制的第一二维分布图如图 11 所示,第二二维分布图如图 12 所示。图 12 的第二二维分布图中也设定了成熟白细胞出现的区域(成熟白细胞区域)。

[0150] 用显微镜算出血样 D 中的原始粒细胞比率为 58.5%。实施例 7 中测定的原始粒细胞比率与显微镜算出的原始粒细胞比率结果相近,因此可以断定,用实施例 7 的试剂可以正确地分辨血样中的成熟白细胞和原始粒细胞,正确地对原始粒细胞计数。

[0151] (实施例 8)

[0152] 除使用的不是血样 D 而是血样 G 外,其他与实施例 5 同,计算原始粒细胞比率,所得原始粒细胞比率为 5.5%。实施例 8 绘制的第一二维分布图如图 13 所示,第二二维分布图如图 14 所示。

[0153] 用显微镜算出血样 E 中的原始粒细胞比率,原始粒细胞为 6.3%。实施例 8 中测定的原始粒细胞比率与显微镜算出的原始粒细胞比率结果相近,因此可以断定,用实施例 8 的试剂可以正确地分辨血样中的成熟白细胞和原始粒细胞,正确地对原始粒细胞计数。

[0154] 还在图 13 所示第一二维分布图划定幼稚粒细胞出现的区域(幼稚粒细胞区域),对出现在此区域内的细胞计数,作为幼稚粒细胞数。根据此值,计算幼稚粒细胞对全白细胞数的比率(幼稚粒细胞比率),幼稚粒细胞比率为 10%。

[0155] 此外,用显微镜算出血样 E 中的幼稚粒细胞比率,幼稚粒细胞比率为 13%。实施例 8 测定的幼稚粒细胞比率与显微镜算出的幼稚粒细胞比率结果相近。由此可以断定,用实施例 8 的试剂可以正确地分辨血样中的成熟白细胞、原始粒细胞和幼稚粒细胞,不仅对原始粒细胞,还能正确地对幼稚粒细胞计数。

[0156] (实施例 9)

[0157] 除使用血样 F 而不是血样 D 外,其他与实施例 5 同样,计算出幼稚粒细胞比率,所得幼稚粒细胞比率为 12.4%。实施例 9 绘制的第一二维分布图如图 15 所示,第二二维分布图如图 16 所示。

[0158] 用显微镜算出血样 E 中的原始粒细胞比率和幼稚粒细胞比率,幼稚粒细胞比率为 10.8%。实施例 9 测定的幼稚粒细胞比率与显微镜算出的幼稚粒细胞比率结果相近。由此可以断定,用实施例 9 的试剂可以正确地分辨血样中的成熟白细胞和幼稚粒细胞,能正确地对幼稚粒细胞计数。

[0159] 前述的详细说明及附图是通过文字解释和图示来进行的,其目的不在于限定权利要求的保护范围。本说明书中的具体实施方式的各个变种对于普通技术人员来说显而易见,并处于权利要求及其等同技术的保护范围内。

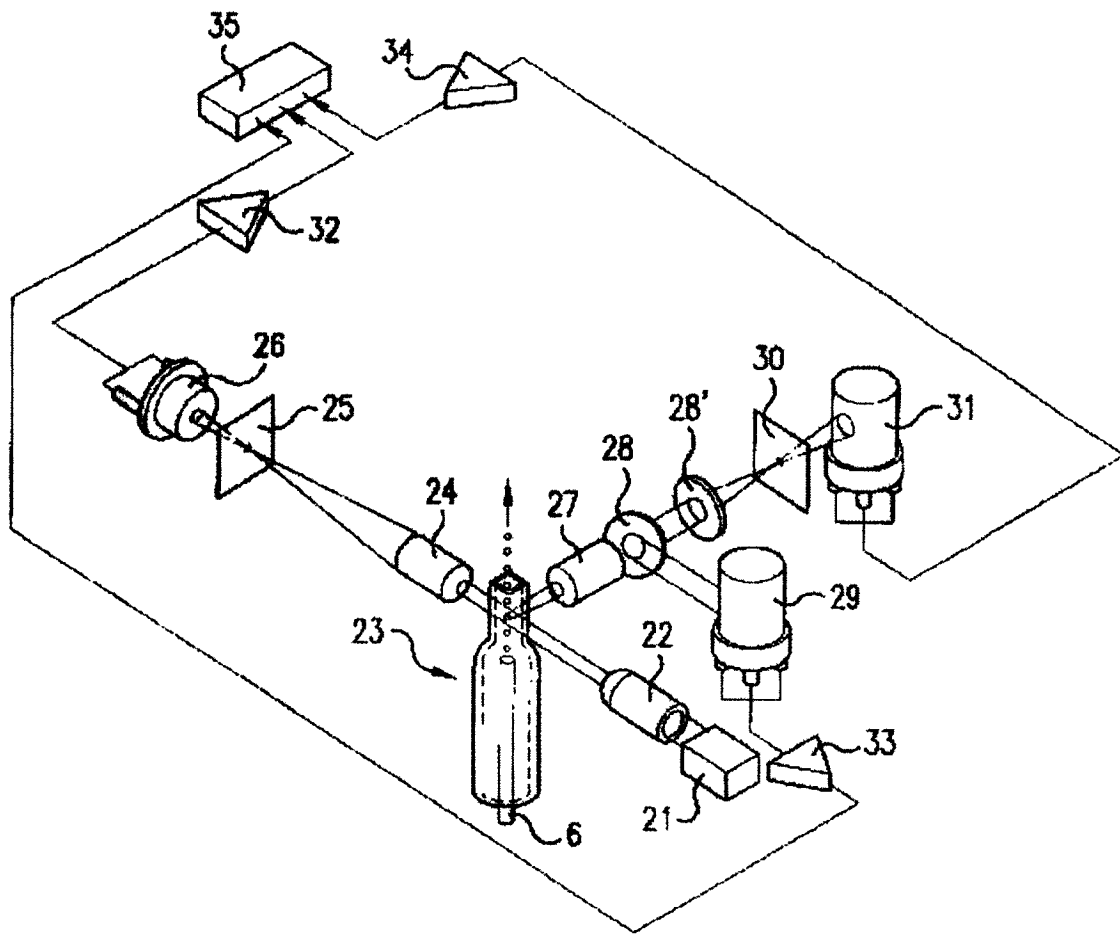


图 1

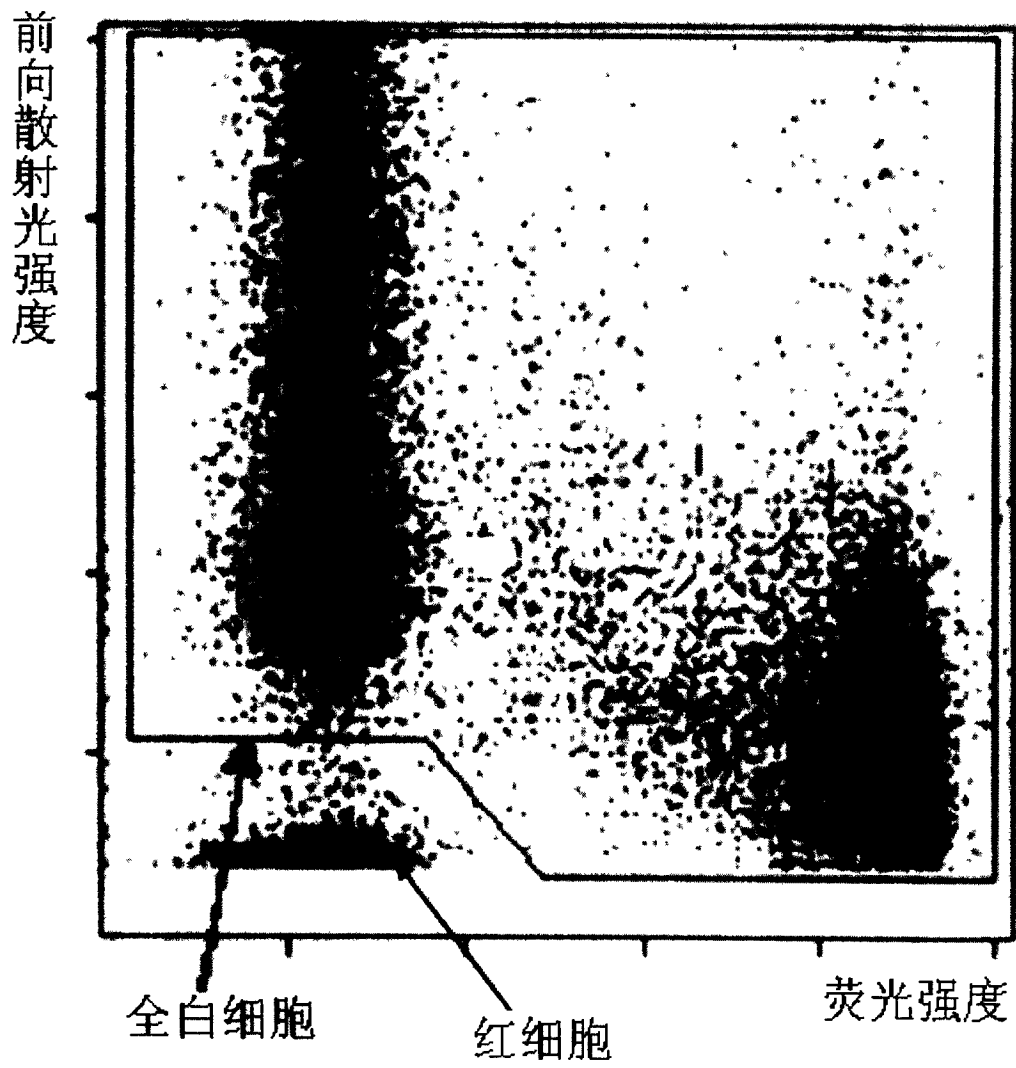


图 2

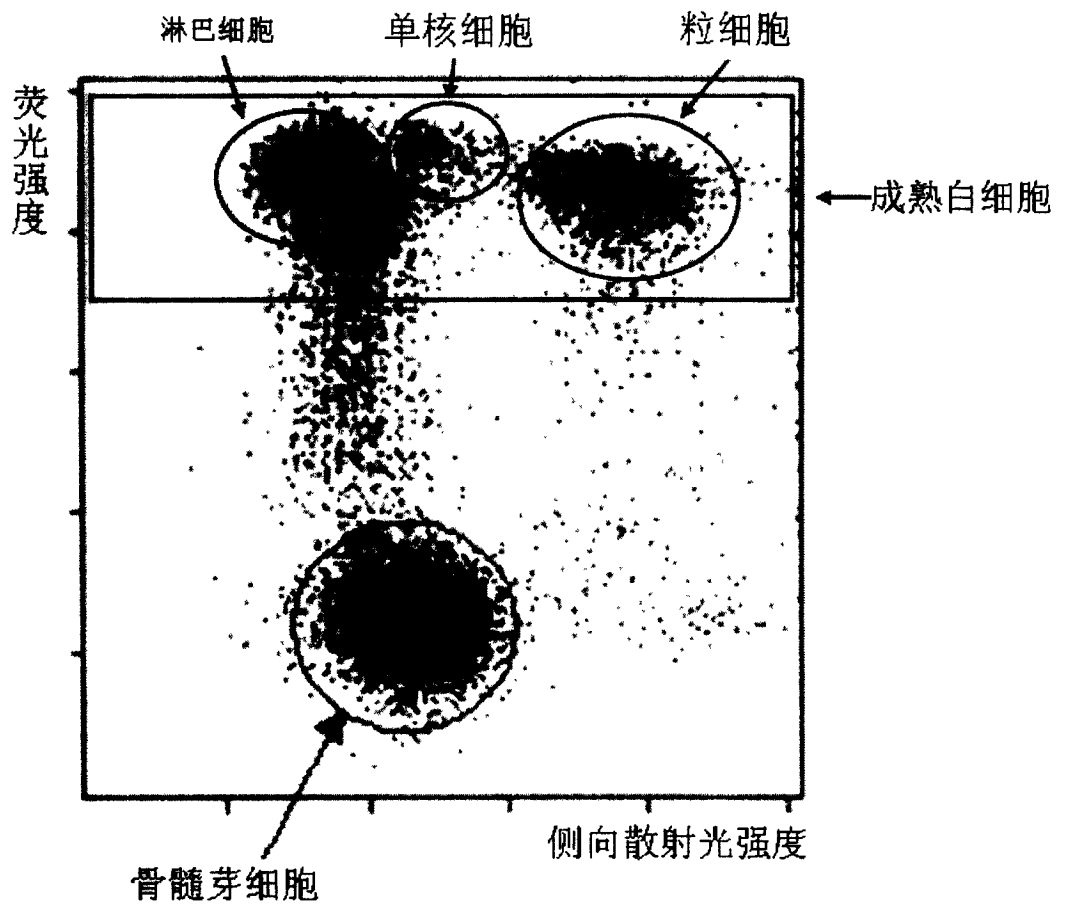


图 3

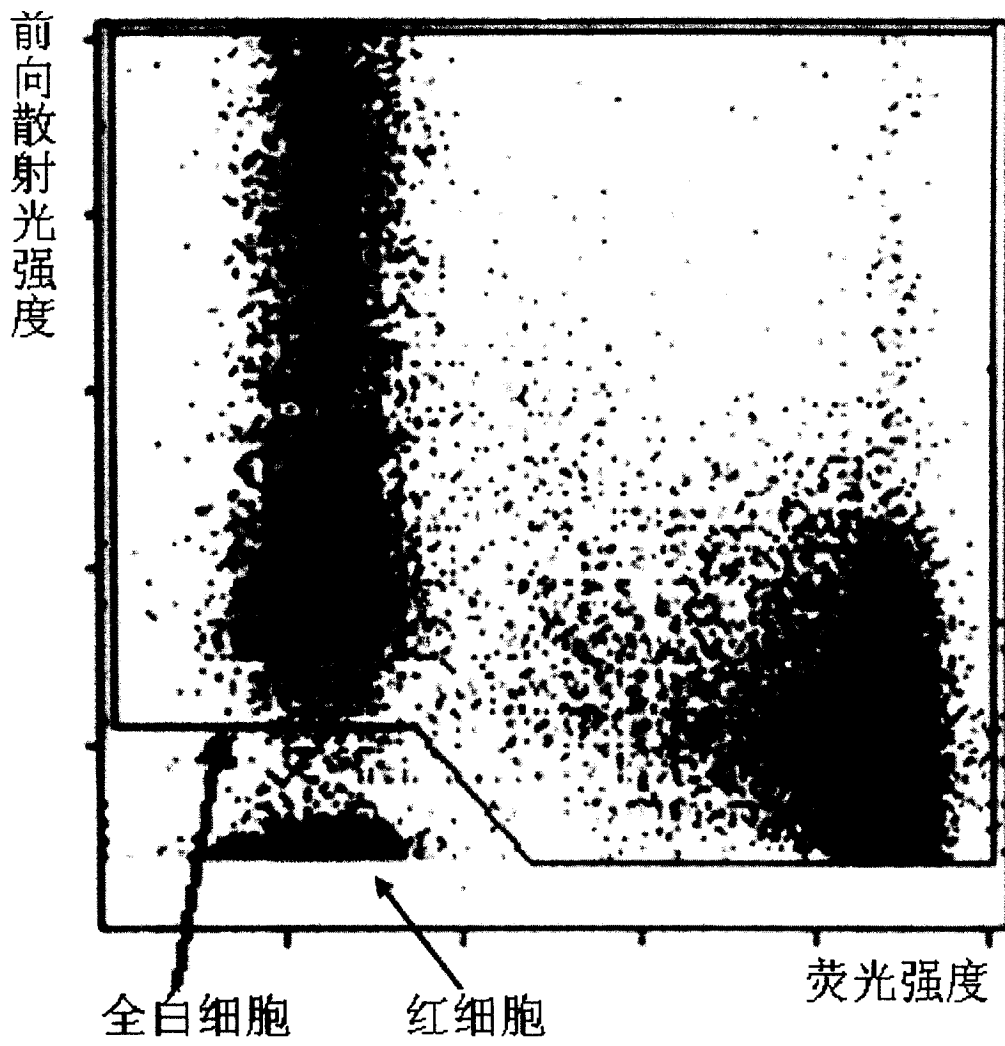


图 4

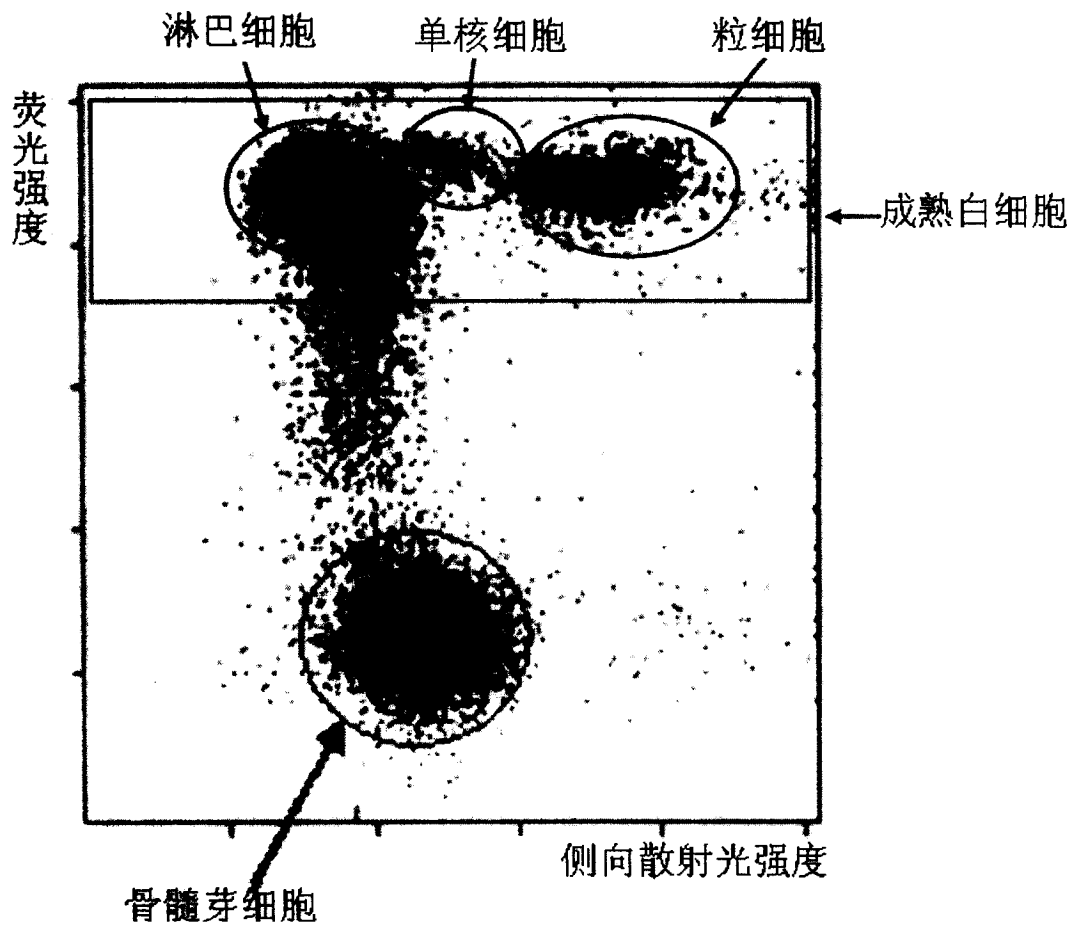


图 5

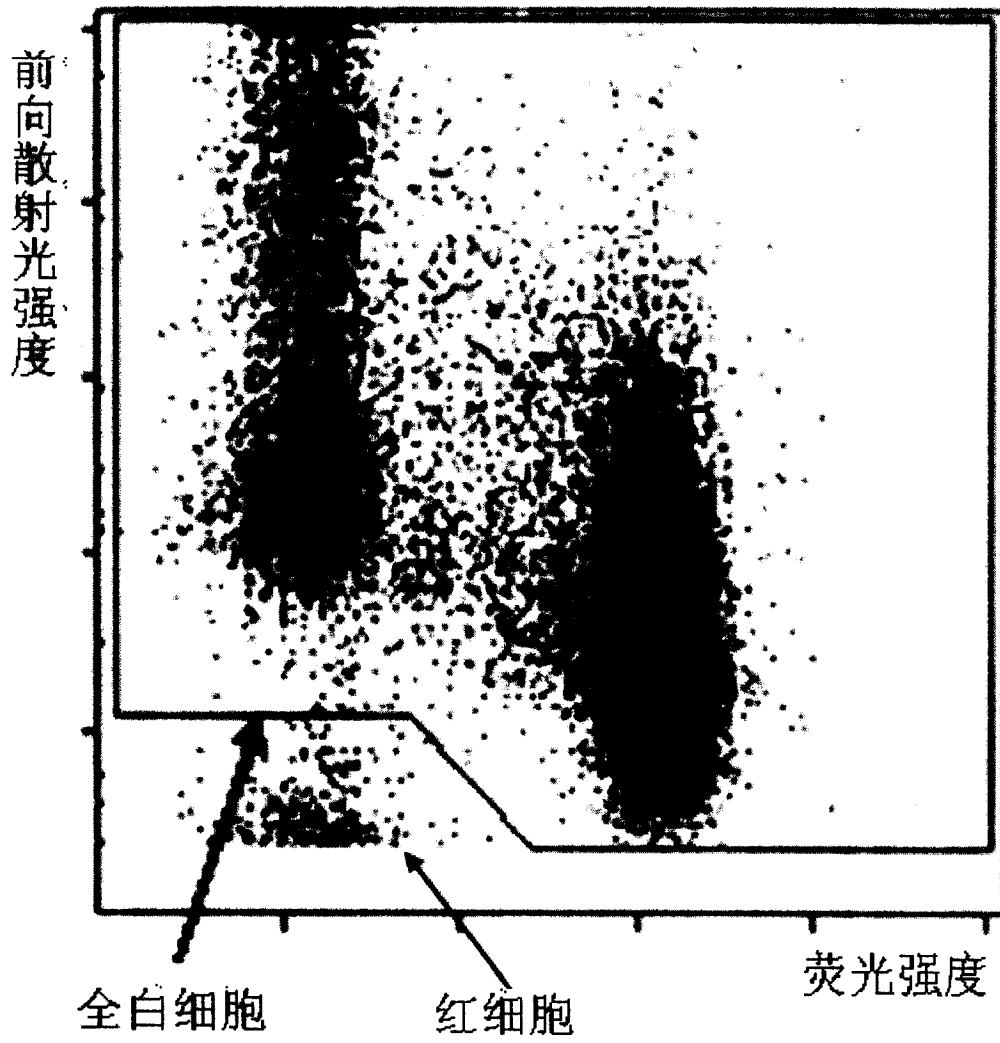


图 6

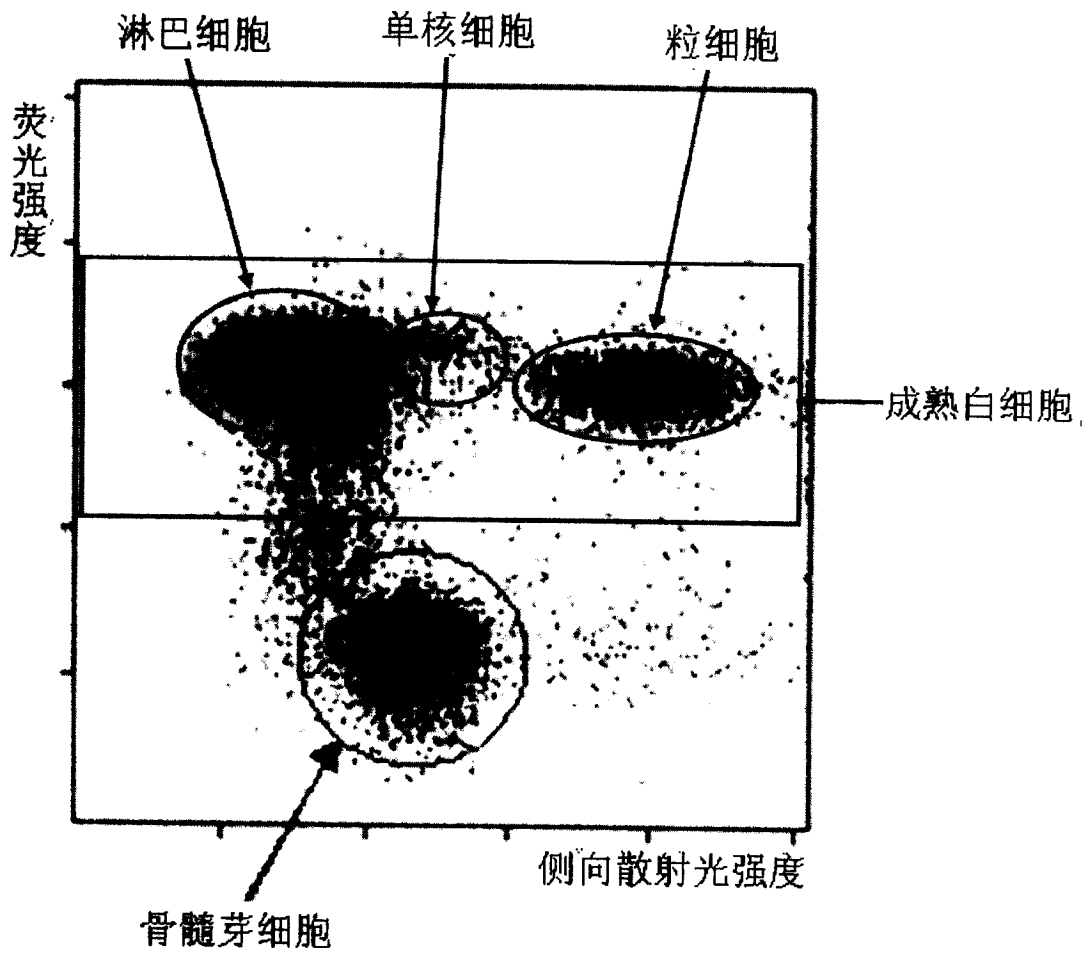


图 7

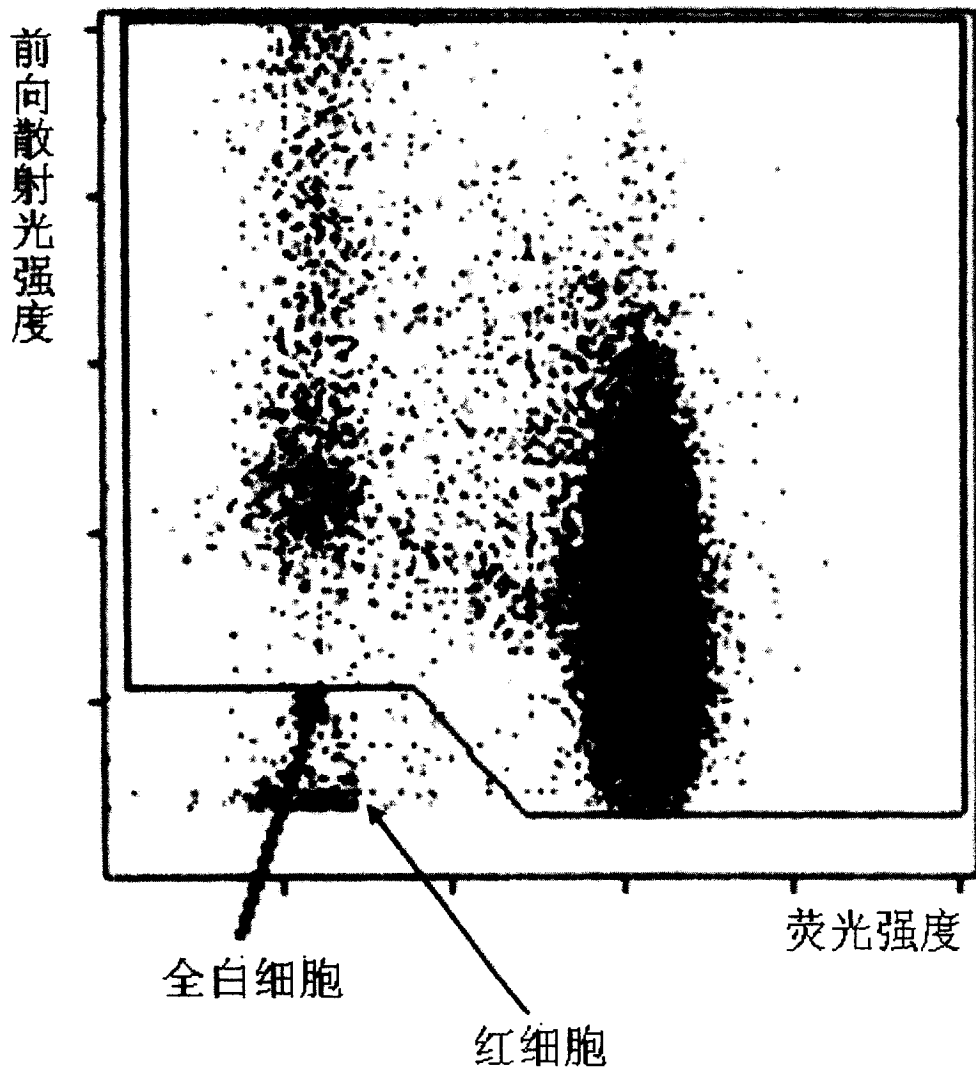


图 8

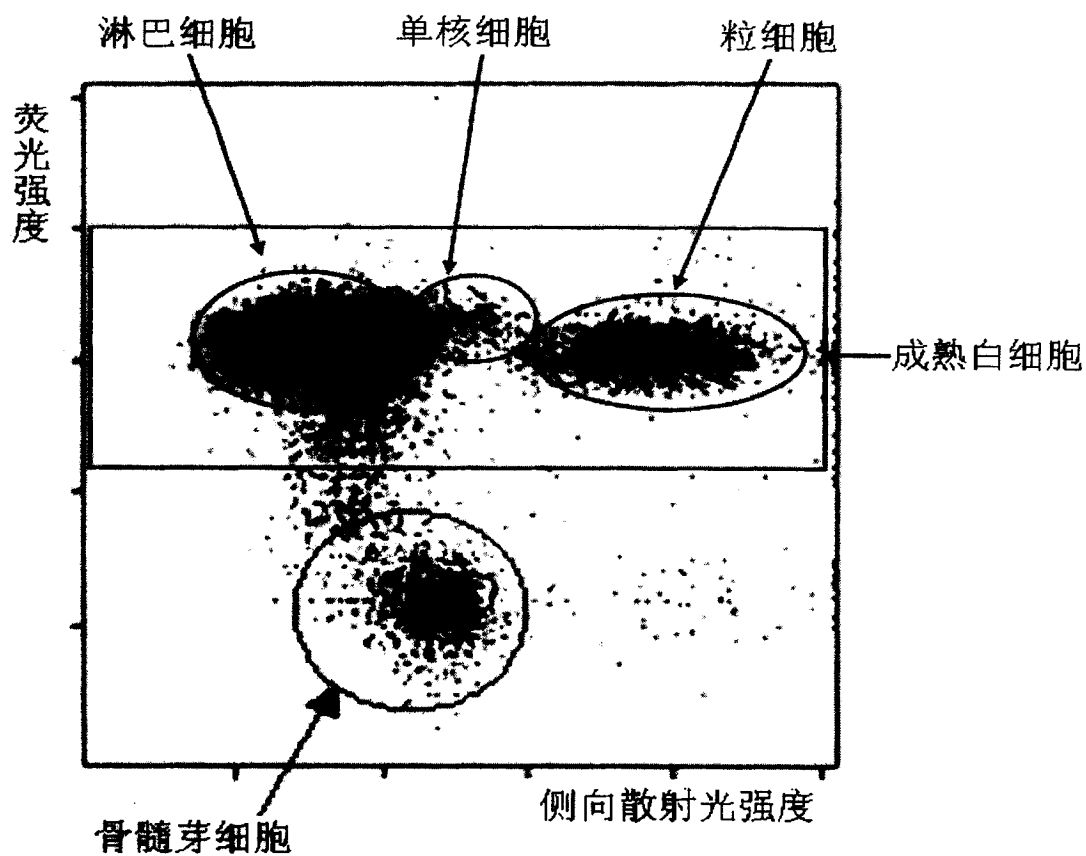


图 9

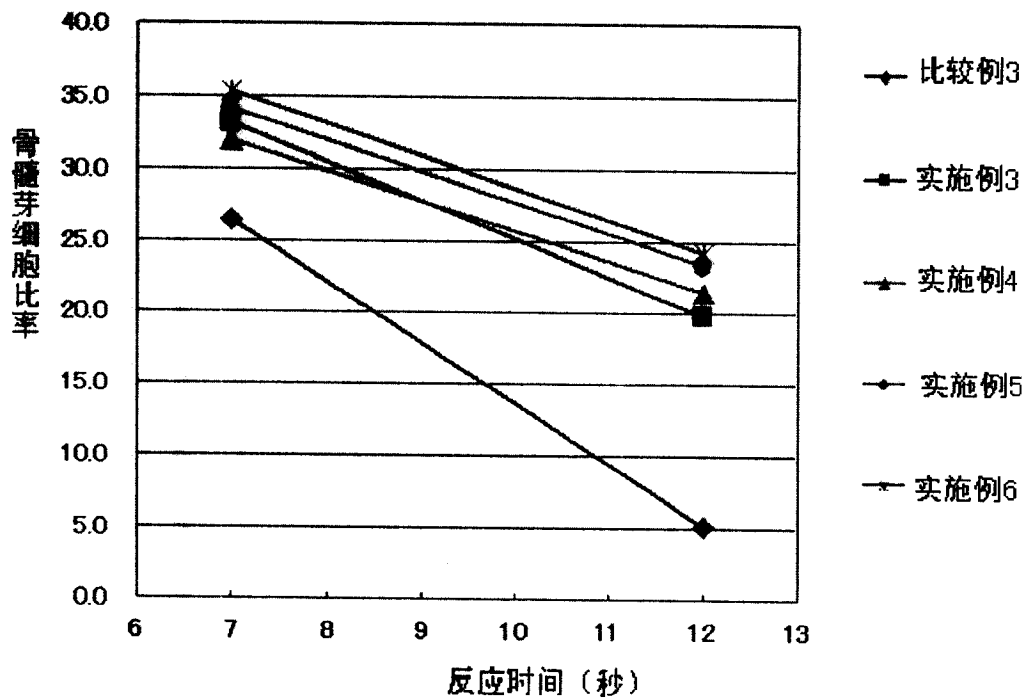


图 10

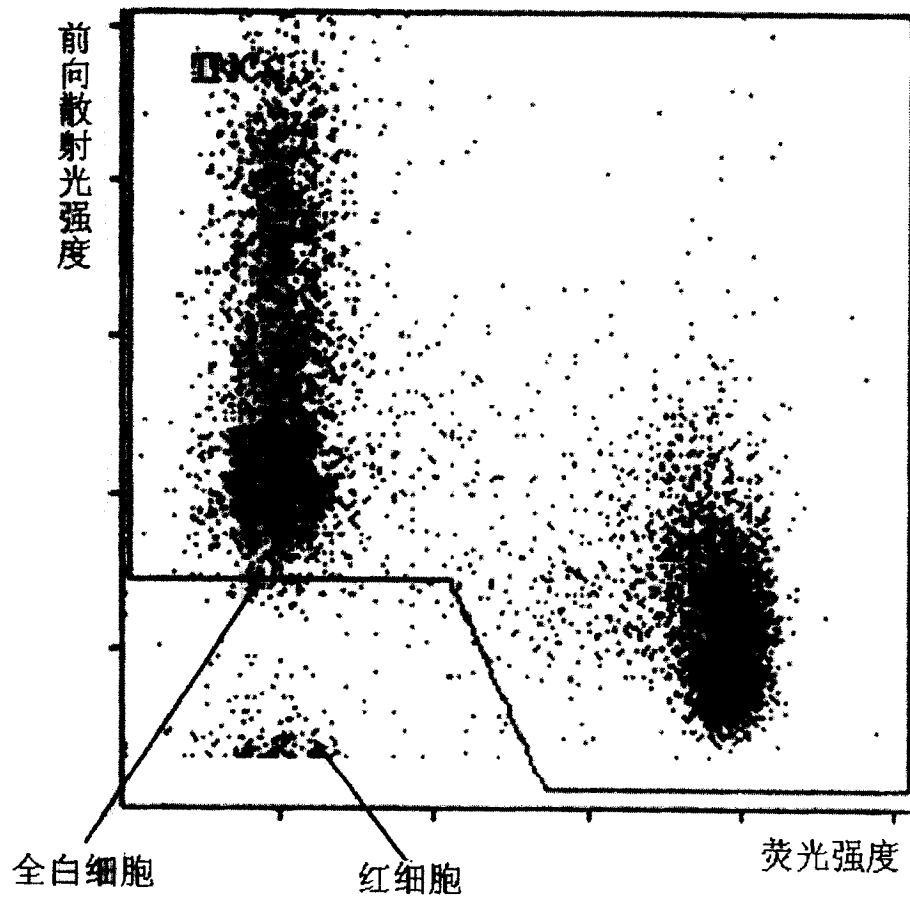


图 11

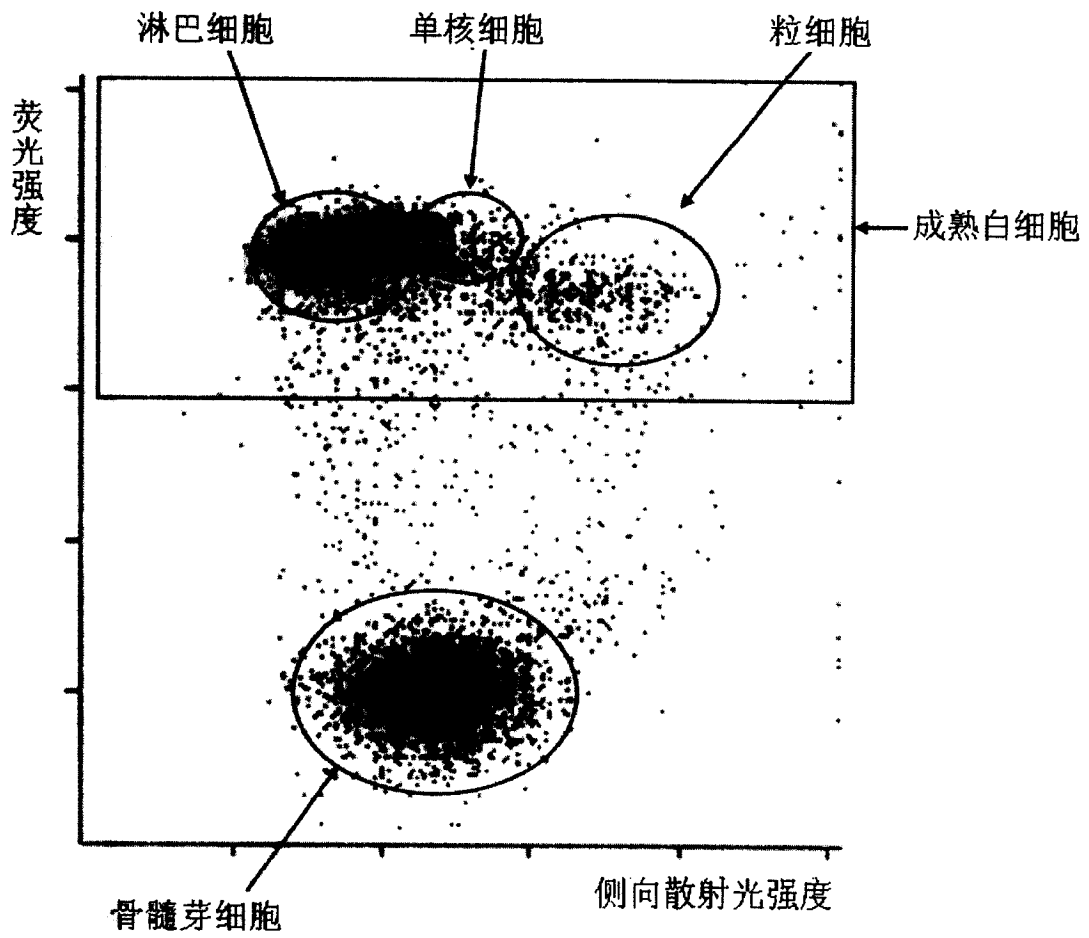


图 12

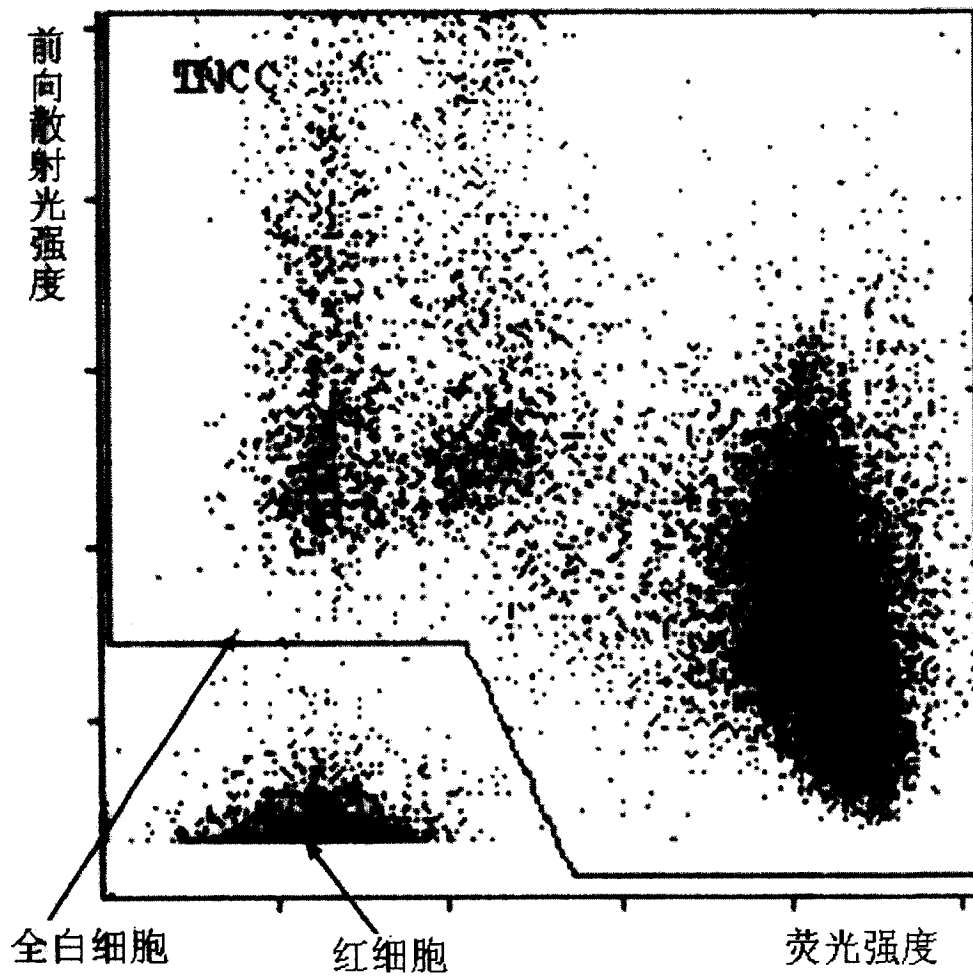


图 13

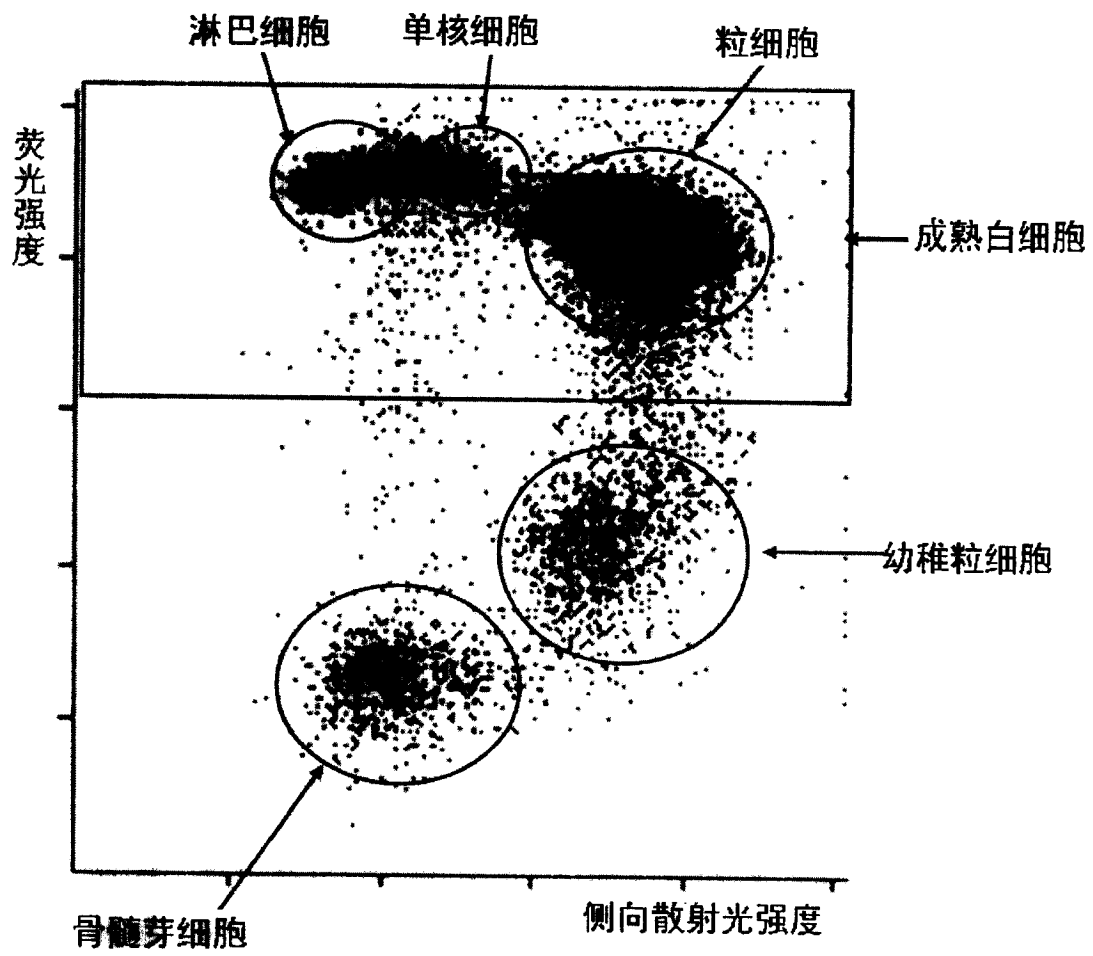
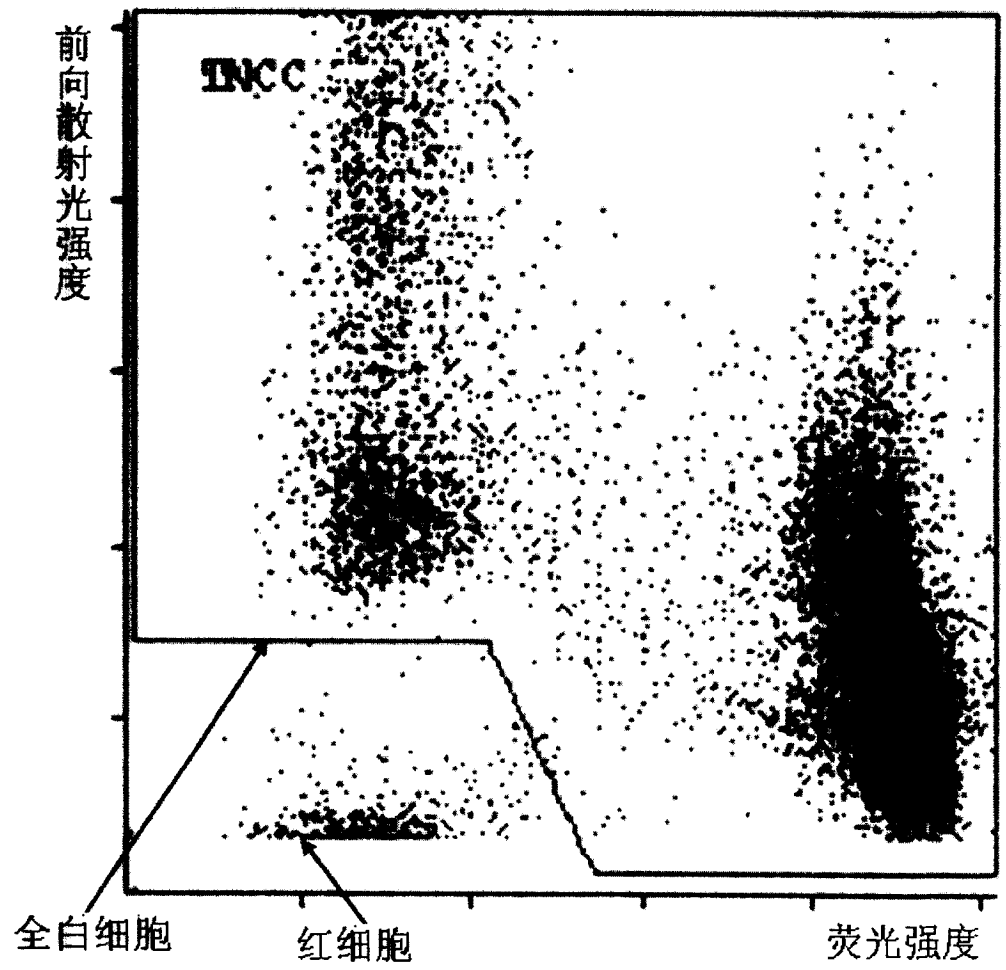


图 14



25

图 15

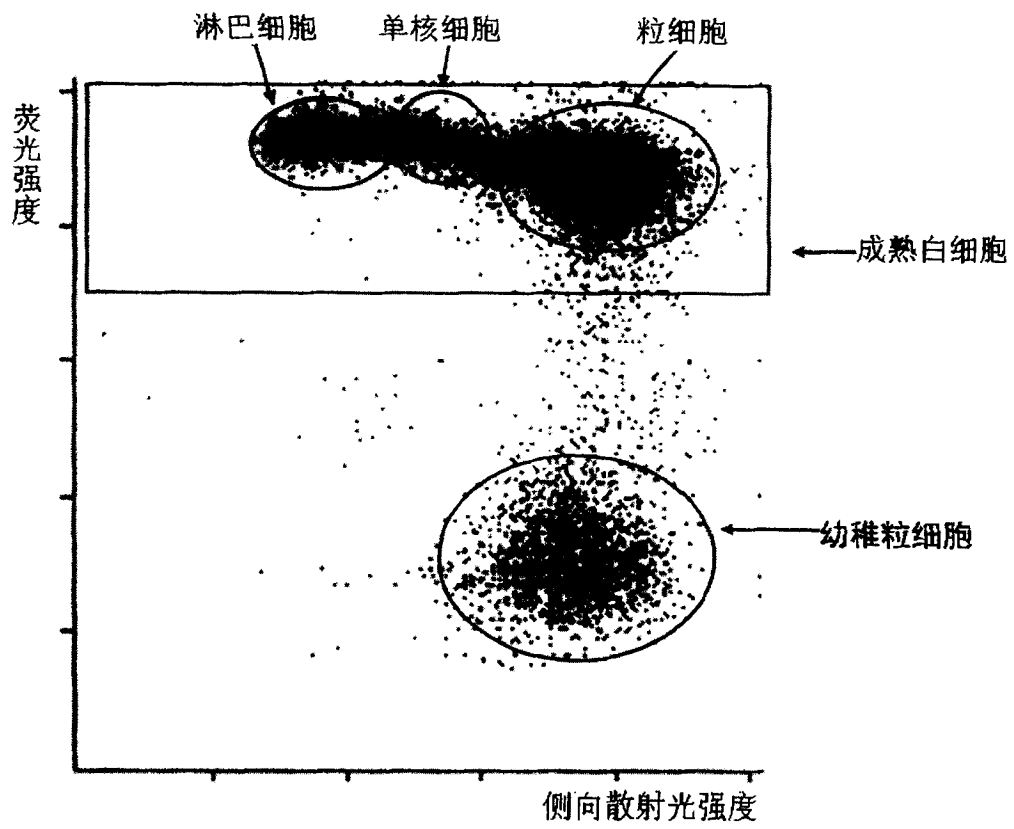


图 16