

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610021034.4

[43] 公开日 2007年11月28日

[11] 公开号 CN 101078721A

[22] 申请日 2006.5.23

[21] 申请号 200610021034.4

[71] 申请人 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司  
地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦

[72] 发明人 许文娟 张利娜 刘兵

[74] 专利代理机构 深圳创友专利商标代理有限公司  
代理人 罗瑶

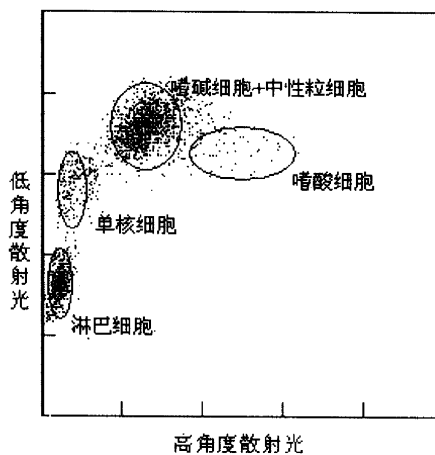
权利要求书2页 说明书14页 附图4页

[54] 发明名称

对白细胞进行分类的试剂及方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于对白细胞进行四分类的试剂，所述试剂包括：a. 能够溶解红细胞，且使白细胞的细胞膜部分损伤的至少一种表面活性剂；b. 能够与白细胞内阳离子结合，使白细胞之间产生形态差异的至少一种带阴离子基团的有机化合物；c. 能够将pH值调整在2~8范围内的缓冲剂。本发明还公开了用上述试剂进行细胞四分类的方法。利用本发明的试剂和方法进行白细胞的四分类时，反应可以在酸性到弱碱性pH条件下进行，温度以及主要成分表面活性剂的种类都具有很宽的选择范围，从而使本发明的应用范围得到极大的拓宽，与现有技术相比有了很大的进步。



1、一种用于对白细胞进行分类的试剂，所述分类是将白细胞分成与淋巴细胞、单核细胞、嗜酸粒细胞分别对应的3个集团，以及与中性粒细胞和嗜碱粒细胞相对应的1个集团共计4个集团，其特征在于，所述试剂包括：

a.能够溶解红细胞，且使白细胞的细胞膜部分损伤的至少一种表面活性剂，所述至少一种表面活性剂是指选自非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂及两性表面活性剂中的一种或几种的组合，但不包括阳离子表面活性剂与阴离子表面活性剂的组合，

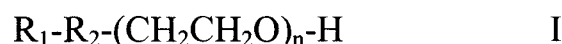
b.能够与白细胞内阳离子结合，使白细胞之间产生形态差异的至少一种带阴离子基团的有机化合物，

c. 能够将 pH 值调整在 2~8 范围内的缓冲剂；

并且当所述至少一种表面活性剂为阳离子表面活性剂与非离子表面活性剂的组合，或者为阴离子表面活性剂与非离子表面活性剂的组合时，所述缓冲剂的 pH 范围为 2~4.5。

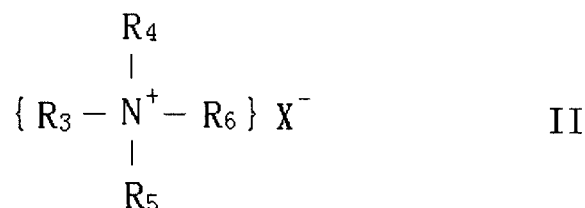
2、根据权利要求1所述的一种用于对白细胞进行分类的试剂，其特征在于：所述试剂进一步包括作为助溶剂的醇类。

3、根据权利要求1所述的一种用于对白细胞进行分类的试剂，其特征在于：所述非离子表面活性剂为具有式 I 所示结构的非离子表面活性剂，



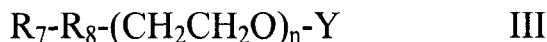
其中， $R_1$  为 C 原子数 8 到 23 的烷基或链烯基， $R_2$  为 -O- 或 -COO-， $n$  为 8-30 的整数。

4、根据权利要求1所述的一种用于对白细胞进行分类的试剂，其特征在于：所述阳离子表面活性剂为具有式 II 所示结构的季铵盐型阳离子表面活性剂，



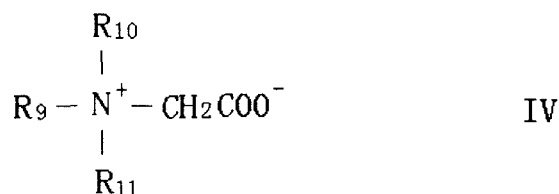
其中  $R_3$  为 C 原子数 6-14 的烷基或链烯基； $R_4$  及  $R_5$  为原子数 1-4 的烷基或链烯基； $R_6$  为 C 原子数为 1-4 的烷基或链烯基或苄基；X 为卤素原子。

5、根据权利要求1所述的一种用于对白细胞进行分类的试剂，其特征在于：所述阴离子表面活性剂为十二烷基磺酸钠，或者是具有式III所示结构的阴离子表面活性剂，



其中， $R_7$ 为C原子数8到22的烷基、链烯基或炔基， $R_8$ 为-O-或-COO-， $n$ 为8-30的整数， $Y$ 为 $-SO_3Na$ ， $-COONa$ ， $-OSO_3Na$ ，或 $-ONa$ 。

6、根据权利要求1所述的一种用于对白细胞进行分类的试剂，其特征在于：所述两性表面活性剂为具有式IV所示结构的两性表面活性剂，



其中， $R_9$ 为C原子数6-14的烷基或链烯基； $R_{10}$ 及 $R_{11}$ 为原子数1-4的烷基或链烯基。

7、根据权利要求1所述的一种用于对白细胞进行分类的试剂，其特征在于：所述带阴离子基团的有机化合物为酸性有机色素。

8、一种采用权利要求1~7中任意一项所述的试剂对白细胞进行分类的方法，其特征在于：所述方法包括步骤，将所述的试剂加入到全血样本中，使白细胞分成与淋巴细胞、单核细胞、嗜酸粒细胞分别对应的3个集团以及与中性粒细胞和嗜碱粒细胞相对应的1个集团共计4个集团，然后通过测定细胞大小和形态信息对所分成的四个集团进行分类计数。

9、根据权利要求8所述的一种对白细胞进行分类的方法，其特征在于：所述分类过程中的反应温度为 $10\sim 40^\circ\text{C}$ 。

10、根据权利要求9所述的一种对白细胞进行分类的方法，其特征在于：所述分类过程中的反应温度为 $35^\circ\text{C}$ 。

11、根据权利要求9所述的一种对白细胞进行分类的方法，其特征在于：所述测定细胞大小信息利用激光散射法采用低角度散射光完成，测定角度为 $2\sim 6$ 度；所述测定细胞形态信息利用激光散射法采用高角度散射光完成，测定角度为 $8\sim 20$ 度。

## 对白细胞进行分类的试剂及方法

### 技术领域

本发明涉及细胞分类所用的试剂及分类方法，特别是涉及一种对血液中的白细胞进行四分类时所用的试剂及分类方法。

### 背景技术

在临床检查领域中，用患者的全血对白细胞进行分类计数工作，在诊断各种疾病时是极其常见并且非常重要的。

迄今为止，用于白细胞分类的装置及方法的专利发表了许多。其中，中国专利 CN95115317.X 公开了一种通过两种试剂完成白细胞的五分类的方法。该两种试剂除都含有非离子表面活性剂和缓冲剂外，第一试剂至少含一种离子表面活性剂和一种带阴离子的有机化合物，将血细胞分成淋巴细胞、单核细胞、嗜酸细胞以及嗜碱细胞加中性粒细胞四类，第二试剂至少含一种离子表面活性剂，将血细胞分成嗜碱细胞和其他细胞类群。该方法通过综合两种结果将白细胞五分类。检测系统为激光散射法。

美国专利 5,618,733 是一篇白细胞五分类试剂专利，通过两种试剂完成白细胞的五分类，这两种试剂除都含有非离子表面活性剂和缓冲剂外，第一试剂至少含一种带阴离子的有机化合物，将血细胞分成淋巴细胞、单核细胞、嗜酸细胞和嗜碱细胞加中性粒细胞四类，第二试剂至少含一种离子表面活性剂，可以是阳离子或两性表面活性剂中一种，将血细胞分成嗜碱细胞和其他细胞类群，综合两种结果将白细胞五分类。

美国专利 5,389,549 是一篇白细胞五分类和计数试剂专利，通过两种试剂，第一试剂为稀释血样的高渗溶液，第二试剂为含阴离子表面活性剂和非离子表面活性剂的溶液，检测系统是射频和直流法。

美国专利 5,538,893 是一篇白细胞五分类试剂专利，试剂至少含一种阳离子表面活性剂和一种非离子表面活性剂，检测系统是光散射和电阻法。

申请号为 88101677、审定号为 CN1018586B 的中国专利是通过一种 pH 2-4 的酸性溶解剂对红细胞快速溶解和白细胞保持完整后加入抑制剂对白细胞进行分类的方法，其检测系统可以使用光散射也可以使用射频/直流

法。

美国专利 5,155,044 是一篇白细胞五分类试剂系统专利，由溶血剂和稀释液组成，溶血剂由两种试剂组成，第一试剂含各种酸及皂苷，可以溶解红细胞，同时白细胞不变；第二试剂为碱性抑制剂，反应终点 PH 为 6-7.5。

美国专利 5,731,206 是一篇白细胞五分类方法和试剂系统专利，溶血剂由两种试剂组成，第一试剂含羧酸和磺酸的衍生物及皂苷，PH 为 2.6-4.0，第二试剂为碱性抑制剂。反应终点 PH 为 6-7.5。

美国专利 5,817,518 是一篇白细胞五分类方法和试剂系统专利，溶血剂由两种试剂组成，第一试剂含烷基磺酸的碱金属盐类、有机酸、无机酸或其混合物及非离子表面活性剂。PH1.4-3.6。第二试剂含聚氧乙烯或聚氧丙烯的共聚物类表面活性剂、十二烷基磺酸钠的高渗碱性溶液。检测方法为直流阻抗和射频法。

美国专利 5,510,267 是一篇白细胞五分类方法和试剂专利，溶血剂含 2-苯氧基乙醇、非离子表面活性剂及缓冲液。检测系统为四角度激光散射法。

以上现有技术中的分类试剂及方法中，大部分对 pH 值有特定的要求，而且 pH 值适用范围都只包含一较窄的范围。而在中国专利 CN95115317.X、美国专利 5,618,733、美国专利 5,389,549、美国专利 5,538,893 中，分类试剂都必须包含非离子表面活性剂，材料的选用范围较窄，同时 pH 值也有一定的限制，比如，中国专利 CN95115317.X 中 pH 值要求在 5-11 之间。这些都限制了上述技术的应用范围。

另外，申请号 88101677、审定号为 CN1018586B 的中国专利中提到的分类技术，其最适反应条件为常温，但随着环境温度发生变化，很难保证处于 25 度恒温状态，所以测量结果随着温度变化会产生波动，降低了结果的准确性。在此方法基础上，如果为了消除温度对反应的影响，需要增加恒温装置，但为了控制在 25 度则不仅需要加热装置，同时需要配备制冷装置，这样大大提高了仪器成本。

### **发明内容**

本发明的目的是针对以上现有技术的不足，提供一种能在酸性到弱碱性的 pH 范围及较宽温度范围内应用，且主要成分具有较宽选择范围的白细胞分类用的试剂及方法。

为实现上述目的，本发明采用了以下技术方案：

本发明公开了一种用于对白细胞进行分类的试剂，所述分类是将白细胞分成与淋巴细胞、单核细胞、嗜酸粒细胞分别对应的3个集团，以及与中性粒细胞和嗜碱粒细胞相对应的1个集团共计4个集团，所述试剂包括：

a.能够溶解红细胞，且使白细胞的细胞膜部分损伤的至少一种表面活性剂，所述至少一种表面活性剂是指选自非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂及两性表面活性剂中的一种或几种的组合，但不包括阳离子表面活性剂与阴离子表面活性剂的组合，

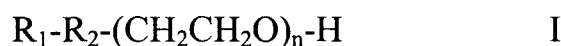
b.能够与白细胞内阳离子结合，使白细胞之间产生形态差异的至少一种带阴离子基团的有机化合物，

c. 能够将pH值调整在2~8范围内的缓冲剂；

并且当所述至少一种表面活性剂为阳离子表面活性剂与非离子表面活性剂的组合，或者为阴离子表面活性剂与非离子表面活性剂的组合时，所述缓冲剂的pH范围为2~4.5。

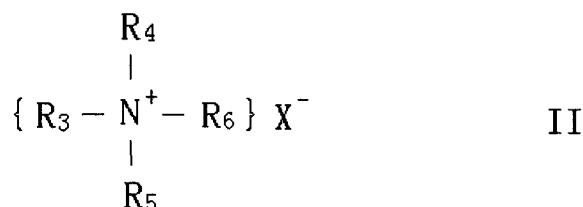
优选的，所述试剂进一步包括作为助溶剂的醇类。

在本发明优选的实施方案中，所述非离子表面活性剂为具有式I所示结构的非离子表面活性剂，



其中， $R_1$ 为C原子数8到23的烷基或链烯基， $R_2$ 为-O-或-COO-，n为8-30的整数。

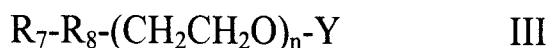
所述阳离子表面活性剂为具有式II所示结构的季铵盐型阳离子表面活性剂，



其中 $R_3$ 为C原子数6-14的烷基或链烯基； $R_4$ 及 $R_5$ 为原子数1-4的烷基或链烯基； $R_6$ 为C原子数为1-4的烷基或链烯基或苄基；X为卤素原子。

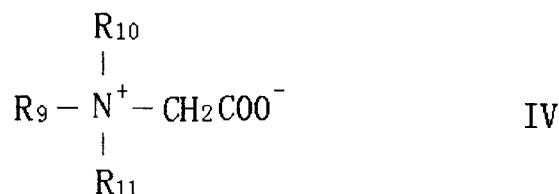
所述阴离子表面活性剂为十二烷基磺酸钠，或者是具有式III所示结构

的阴离子表面活性剂，



其中， $R_7$  为 C 原子数 8 到 22 的烷基、链烯基或炔基， $R_8$  为 -O- 或 -COO-， $n$  为 8-30 的整数， $Y$  为  $-SO_3Na$ ， $-COONa$ ， $-OSO_3Na$ ，或  $-ONa$ 。

所述两性表面活性剂为具有式 IV 所示结构的两性表面活性剂，



其中， $R_9$  为 C 原子数 6-14 的烷基或链烯基； $R_{10}$  及  $R_{11}$  为原子数 1-4 的烷基或链烯基。

所述带阴离子基团的有机化合物为酸性有机色素。

本发明还公开了一种对白细胞进行分类的方法，所述方法包括步骤，将上述的试剂加入到全血样本中，使白细胞分成与淋巴细胞、单核细胞、嗜酸粒细胞分别对应的 3 个集团以及与中性粒细胞和嗜碱粒细胞相对应的 1 个集团共计 4 个集团，然后通过测定细胞大小和形态信息对所分成的四个集团进行分类计数。

所述分类过程中的反应温度为  $10\sim 40^\circ\text{C}$ ，优选的反应温度为  $35^\circ\text{C}$ 。

所述测定细胞大小信息利用激光散射法采用低角度散射光完成，测定角度为 2-6 度；所述测定细胞形态信息利用激光散射法采用高角度散射光完成，测定角度为 8-20 度。

由于采用了以上的方案，使本发明具备的有益效果在于：

利用本发明的试剂和方法进行白细胞的四分类，相比较现有技术，能够在酸性到弱碱性的 pH 条件下进行，而且该 pH 值范围不会对结果造成不良影响，从而扩充了本发明的试剂及方法的使用条件。另外，本发明的试剂中所用的主要成份表面活性剂，具有非常宽的选择范围，阳离子、阴离子、非离子、两性的表面活性剂以及它们的组合（除了阳离子表面活性剂与阴离子表面活性剂的组合）都可用于本发明，并且选用以上各种表面活性剂，都能实现白细胞的四分类，并保证结果的准确性。此外，利用本发明的试剂及方法进行白细胞分类时，反应温度也具有较大的选择范围，反

应温度只要固定在 10~40℃范围的任一温度，就都能保证分类结果的稳定；而反应能够在高于室温但不超过 40℃范围的温度下进行，能够保证在实际应用中，只需加热装置就可以提供恒温，而不需要制冷装置，从而大大节约了仪器成本。

以上各方面优点使得本发明的应用范围得到极大的拓宽，在原料的选择及反应条件的适用方面，与现有技术相比有了很大的进步。

### 附图说明

图 1 是利用本发明实施例 1 的试剂进行白细胞四分类计数时的低角度散射光及高角度散射光的散射图。

图 2 是利用本发明实施例 2 的试剂进行白细胞四分类计数时的低角度散射光及高角度散射光的散射图。

图 3 是利用本发明实施例 3 的试剂进行白细胞四分类计数时的低角度散射光及高角度散射光的散射图。

图 4 是利用本发明实施例 4 的试剂进行白细胞四分类计数时的低角度散射光及高角度散射光的散射图。

图 5 是利用本发明实施例 5 的试剂进行白细胞四分类计数时的低角度散射光及高角度散射光的散射图。

图 6 是利用本发明实施例 6 的试剂进行白细胞四分类计数时的低角度散射光及高角度散射光的散射图。

图 7 是利用本发明实施例 7 的试剂进行白细胞四分类计数时的低角度散射光及高角度散射光的散射图。

### 具体实施方式

本发明的试剂与方法可用于对全血中的白细胞进行四分类。将本发明的试剂加入全血中后，试剂中的成分能够迅速溶解红细胞，并使不同类型的白细胞发生形态与大小方面的差异，分成与淋巴细胞、单核细胞、嗜酸粒细胞相对应的 3 个集团以及与中性粒细胞和嗜碱粒细胞相对应的 1 个集团共 4 个集团。再使用激光散射法，采用低角度散射光测定细胞的大小信息以及采用高角度散射光测定细胞的形态信息，并通过对散射光进行检测，从而对四个集团的白细胞分别进行分类计数。

本发明试剂的主要成分包括能够溶解红细胞、且使白细胞的细胞膜部分损伤的至少一种表面活性剂，能够与白细胞内阳离子结合、使白细胞之

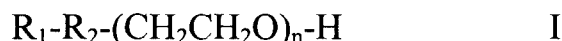


间产生形态差异的至少一种带阴离子基团的有机化合物以及能够将 pH 值调整在 2~8 范围内的缓冲剂。

本发明所用的表面活性剂，具有很宽的选择范围，可以选用非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂以及两性表面活性剂中的一种，也可选用它们的任意组合，但阳离子表面活性剂与阴离子表面活性剂的组合除外（阳离子表面活性剂与阴离子表面活性剂组合时可能会产生沉淀，因此不能用于本发明）。

利用本发明的试剂进行白细胞的分类时，pH 值范围对分类结果没有绝对的影响，一般在 2-8 范围内都可以满足要求，但对于阴离子或阳离子表面活性剂与非离子表面活性剂的组合，pH 值范围应当限定在 2-4.5 范围内。缓冲剂的选择没有特定的要求，常用的缓冲系统如甲酸、邻苯二甲酸、乙酸、磷酸、TRIS 等，都可以用于本发明。缓冲剂的使用量通常在 10-500mM。

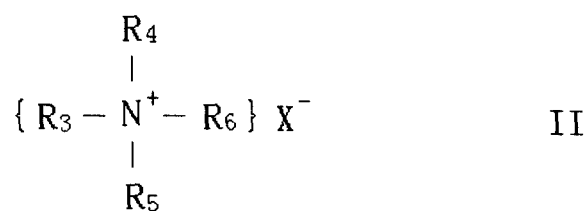
其中，对于非离子表面活性剂，本发明优选具有如式 I 所示结构的非离子表面活性剂：



其中， $R_1$  为 C 原子数 8 到 23 的烷基或链烯基， $R_2$  为 -O- 或 -COO-， $n$  为 8-30 的整数。作为  $R_1$  的原子数 8-23 的烷基或链烯基，可以是辛基、癸基、月桂基、十四烷基、鲸蜡基、硬脂酰等，特别优选月桂基、十四烷基、鲸蜡基等的直链烷基。

上述非离子表面活性剂，其用量应足以溶解红细胞，并造成白细胞的细胞膜部分损伤。具体用量为非离子表面活性剂在本发明试剂中的重量体积百分含量(W/V)为 0.1-1%，优选 0.1-0.7%，最优选 0.2-0.5%，也可以根据使用种类作适当调整。

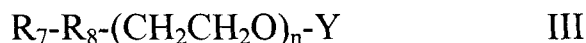
对于阳离子表面活性剂，本发明优选具有如式 II 所示结构的季铵盐型阳离子表面活性剂，



其中  $R_3$  为 C 原子数 6-14 的烷基或链烯基； $R_4$  及  $R_5$  为原子数 1-4 的烷基或链烯基； $R_6$  为 C 原子数为 1-4 的烷基或链烯基或苄基；X 为卤素原

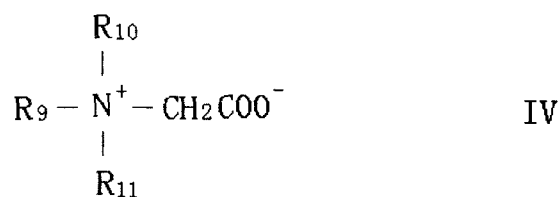
子。作为  $R_3$  的原子数 6-14 的烷基或链烯基，可以是己基、辛基、癸基、月桂基、十四烷基等，特别优选辛基、癸基、月桂基等的直链烷基。作为  $R_4$  及  $R_5$  的 C 原子数 1-4 的烷基或链烯基，可以是甲基、乙基、丙基、丁基、丁烯基等，特别优选甲基、乙基、丙基。

对于阴离子表面活性剂，本发明优选十二烷基磺酸钠(SDS)以及具有如式 III 所示结构的阴离子表面活性剂，



其中， $R_7$  为 C 原子数 8 到 22 的烷基、链烯基或炔基， $R_8$  为 -O- 或 -COO-， $n$  为 8-30 的整数， $Y$  为  $-SO_3Na$ ， $-COONa$ ， $-OSO_3Na$  或  $-ONa$ 。作为  $R_7$  的 C 原子数 8-22 的烷基、链烯基或炔基，可以是辛基、癸基、月桂基、十四烷基等，特别优选癸基、月桂基等的直链烷基。

对于两性表面活性剂，本发明优选具有如式 IV 所示结构的两性表面活性剂，



其中， $R_9$  为 C 原子数 6-14 的烷基或链烯基； $R_{10}$  及  $R_{11}$  为原子数 1-4 的烷基或链烯基。作为  $R_9$  的原子数 6-14 的烷基或链烯基，可以是己基、辛基、癸基、月桂基、十四烷基等，特别优选辛基、癸基、月桂基等的直链烷基。作为  $R_{10}$  及  $R_{11}$  的 C 原子数 1-4 的烷基或链烯基，可以是甲基、乙基、丙基、丁基、丁烯基等，特别优选甲基、乙基、丙基。

可用于本发明的上述离子表面活性剂，其用量应足以溶解红细胞，并造成白细胞的细胞膜部分损伤。在本发明试剂系统中的用量通常为 50-6000mg/L，优选 200-5000mg/L，最优选 500-4000mg/L。具体用量也可以根据使用的表面活性剂的种类作适当调整。

表 1 列举了能够用于本发明的一些表面活性剂的种类及其最适用量。这些表面活性剂可以只使用其中的一种，也可以一种以上任意组合使用(阳离子表面活性剂与阴离子表面活性剂的组合除外)。

表1 表面活性剂的最适用量

表面活性剂名称	最适用量
聚氧乙烯(8) 硬脂酸醚(Myrij 45)	1000-8000mg/L
聚氧乙烯(10) 十六烷基醚 (Brij 56)	1000-8000mg/L
聚氧乙烯(23) 十六烷基醚(Brij 35)	1000-5000mg/L
辛基三甲基氯化铵(OTAC,PTI)	2000-4000mg/L
辛基三甲基溴化铵(OTAB,PTI)	1500-3500mg/L
癸基三甲基氯化铵(DTAC,PTI)	1500-3000mg/L
癸基三甲基溴化铵(DTAB,PTI)	1000-2500mg/L
十二烷基三甲基氯化铵(LTAC,PTI)	1000-2000mg/L
十二烷基三甲基溴化铵(LTAB,PTI)	1000-1500mg/L
十二烷基氯化吡啶(PTI)	500-1500mg/L
十四烷基三甲基氯化铵(MTAC,PTI)	500-1000mg/L
十四烷基三甲基溴化铵(MTAB,PTI)	500-1000mg/L
十二烷基聚氧乙烯(10)磺酸钠	1000-2000mg/L
十二烷基磺酸钠(SDS)	1000-3000mg/L
甘氨酸	500-5000mg/L

无论使用哪一种表面活性剂，其对白细胞的溶解力，只要能使白细胞膜开孔到胞质可以部分溢出，与阳离子结合的有机化合物能够进入的程度即可，最好使用远远少于使细胞完全裸核时的用量。表面活性剂的溶血效果和所带侧链（非离子表面活性剂中的  $R_1$ 、阳离子表面活性剂中的  $R_3$ 、阴离子表面活性剂中的  $R_7$  以及两性表面活性剂中的  $R_9$ ）的链长是成正比的，侧链的 C 原子数越多，溶血能力越强，所需要的浓度就越低。

本发明的主要成分除表面活性剂外，还包括一种有机化合物，该有机化合物可以和细胞内阳离子结合导致细胞类群间形态差异。这种有机化合物，带有疏水基团（如由芳香族组成的基团、由 C 原子数 6 个以上的烃基形成的基团以及 C 原子数大于 6 的杂环等）及阴离子基团(如羧基、磺酸基等)，在水中带负电荷，能与白细胞结合使白细胞形态发生改变。几乎所有酸性有机色素如：酸性蓝系列、直接蓝、酸性绿、酸性黄、酸性橙、甲基

红、甲基橙、苯胺蓝、茜素黄等都可以满足要求。使用量通常为 50-1000mg/L，优选 100-500mg/L。

此外，本发明中还可以含有一定量的醇类作为助溶剂。醇类作为助溶剂对种类没有特别要求，甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、2-苯氧乙醇等均可用于本发明。作为助溶剂的醇类，其用量占本发明的试剂的体积百分比浓度通常为 0.1-10%左右。

在本发明的试剂系统中，还可以加入一定量的 NaCl 以调整溶液的渗透压至合适范围。

本发明的试剂系统可以配制为一种试剂，也可以配制为两种试剂组合使用。作为两种试剂组合使用时，两种试剂的 pH 值可以相同，也可以不同。当使用两种试剂组合使用时，可以通过在第二试剂中加入带有疏水基团及阴离子基团的有机色素将嗜酸粒细胞从其他粒细胞中分离出来。

利用本发明的方法对白细胞进行分类的具体过程包括，将本发明的上述试剂加入全血中混合一定时间后，检测细胞的形态和大小信息，根据细胞形态与大小的不同将细胞分成与淋巴细胞、单核细胞、嗜酸粒细胞相对应的 3 个集团以及与中性粒细胞和嗜碱粒细胞相对应的 1 个集团共 4 个集团，检测系统同时对四类细胞进行分类计数。

血样与本发明试剂的混合比例没有特别的限制，但通常按照血样与本发明试剂的体积比为 1:10~100 的比例混合。通常在两者混合 12~30 秒后就可以进行检测。

利用本发明的试剂及方法进行白细胞分类时，在 10~40℃ 温度范围内均可以进行。对每一个具体的反应，只要将反应温度固定在 10~40℃ 范围的任一温度下，就都能够保证分类结果的稳定。本发明优选的温度为 35℃。选用该温度的原因是由于该温度高于室温，因此在实际应用中只需加热装置就可以实现恒温，而不必增加制冷装置，大大节约了仪器成本。

本发明检测细胞的形态和大小信息的方法优选使用激光检测法。该方法可以利用公知的装置，采用测定角度为 2-6 度的低角度散射光来测定细胞的大小信息，并采用测定角度为 8-20 度的高角度散射光测定细胞的形态信息。该装置可以选用如中国专利 95115317.X 中所描述的装置，也可以选用本领域技术人员所公知的其他装置。而散射光的检测可以通过常用的光电二极管传感器完成。

下面列举具体的实施例

### 实施例 1

一种用于白细胞四分类的试剂，该试剂由以下成分组成：

邻苯二甲酸	1g
NaCl	0.2g
2-苯氧乙醇	10g
Brij 35	3.4g
酸性蓝	0.15g
补水到	1L
PH	2.5

按上述配方配制的试剂将 PH 调整到 2.5，渗透压 100 mOsm。

在温度保持 25 度的条件下，在 30  $\mu$ l 血中加入 0.5ml 上述试剂。混合 12 秒后开始用激光检测法检测白细胞。采用测定角度为 2-6 度的低角度散射光测定细胞的大小信息，并采用测定角度为 8-20 度的高角度散射光测定细胞的形态信息。结果如图 1 所示，白细胞被分成淋巴细胞、单核细胞、嗜酸细胞及中性粒细胞+嗜碱细胞四类。

### 实施例 2

一种用于白细胞四分类的试剂，该试剂由以下成分组成：

NaCl	0.2g
甲醇	2g
SDS	1.5g
磷酸二氢钠	3.08g
磷酸氢二钠	4.87g
酸性蓝	0.15g
补水到	1L
PH	6.5

按上述配方配制的试剂将 PH 调整到 6.5，渗透压 100 mOsm。

在温度保持 35 度的条件下，在 30  $\mu$ l 血中加入 1ml 上述试剂。混合 20 秒后开始用激光检测法检测白细胞。采用测定角度为 2-6 度的低角度散射光测定细胞的大小信息，并采用测定角度为 8-20 度的高角度散射光测定细胞的形态信息。结果如图 2 所示，白细胞被分成淋巴细胞、单核细胞、嗜酸细胞及中性粒细胞+嗜碱细胞四类。

### 实施例 3

一种用于白细胞四分类的试剂，该试剂由以下成分组成：

NaCl	0.3g
甲醇	3g
十二烷基甘氨酸	1.2g
三羟甲基氨基甲烷	3.05g
HCl	0.82g
酸性蓝	0.15g
补水到	1L
PH	7.2

按上述配方配制的试剂将 PH 调整到 7.2，渗透压 140mOsm。

在温度保持 35 度的条件下，在 30  $\mu$ l 血中加入 1.5ml 上述试剂。混合 20 秒后开始用激光检测法检测白细胞。采用测定角度为 2-6 度的低角度散射光测定细胞的大小信息，并采用测定角度为 8-20 度的高角度散射光测定细胞的形态信息。结果如图 3 所示，白细胞被分成淋巴细胞、单核细胞、嗜酸细胞及中性粒细胞+嗜碱细胞四类。

### 实施例 4

一种用于白细胞四分类的试剂，该试剂由以下成分组成：

NaCl	0.3g
2-苯氧乙醇	10g
癸基三甲基溴化铵	6.1g

---

乙酸	1.95g
酸性蓝	0.15g
补水到	1L
PH	4.8

按上述配方配制的试剂将 PH 调整到 4.8，渗透压 140mOsm。

在温度保持 25 度的条件下，在 30  $\mu$ l 血中加入 2ml 上述试剂。混合 30 秒后开始用激光检测法检测白细胞。采用测定角度为 2-6 度的低角度散射光测定细胞的大小信息，并采用测定角度为 8-20 度的高角度散射光测定细胞的形态信息。结果如图 4 所示，白细胞被分成淋巴细胞、单核细胞、嗜酸细胞及中性粒细胞+嗜碱细胞四类。

#### 实施例 5

一种用于白细胞四分类的试剂，该试剂由以下成分组成：

NaCl	0.2g
甲醇	2g
Brij 35	1.4g
SDS	1.2g
甲酸	1.3g
酸性蓝	0.15g
补水到	1L
PH	3.8

按上述配方配制的试剂将 PH 调整到 3.8，渗透压 100mOsm。

在温度保持 35 度的条件下，在 30  $\mu$ l 血中加入 2ml 上述试剂。混合 15 秒后开始用激光检测法检测白细胞。采用测定角度为 2-6 度的低角度散射光测定细胞的大小信息，并采用测定角度为 8-20 度的高角度散射光测定细胞的形态信息。结果如图 4 所示，白细胞被分成淋巴细胞、单核细胞、嗜酸细胞及中性粒细胞+嗜碱细胞四类。

#### 实施例 6

一种用于白细胞四分类的试剂，该试剂由以下成分组成：

NaCl	0.2g
甲醇	2g
十二烷基甘氨酸	1.2g
SDS	0.75g
磷酸二氢钠	3.08g
磷酸氢二钠	4.87g
酸性蓝	0.15g
补水到	1L
PH	7.5

按上述配方配制的试剂将 PH 调整到 7.5，渗透压 100mOsm。

在温度保持 25 度的条件下，在 30  $\mu$ l 血中加入 1ml 上述试剂。混合 15 秒后开始用激光检测法检测白细胞。采用测定角度为 2-6 度的低角度散射光测定细胞的大小信息，并采用测定角度为 8-20 度的高角度散射光测定细胞的形态信息。结果如图 4 所示，白细胞被分成淋巴细胞、单核细胞、嗜酸细胞及中性粒细胞+嗜碱细胞四类。

#### 实施例 7

一种用于白细胞四分类的试剂，该试剂由以下成分组成：

邻苯二甲酸	1g
NaCl	0.2g
2-苯氧乙醇	10g
癸基三甲基溴化铵	5.4g
十二烷基甘氨酸	1.2g
酸性蓝	0.15g
补水到	1L
PH	2.8

按上述配方配制的试剂将 PH 调整到 2.8，渗透压 130mOsm。



---

在温度保持 35 度的条件下，在 30  $\mu$ l 血中加入 1.2ml 上述试剂。混合 14 秒后开始用激光检测法检测白细胞。采用测定角度为 2-6 度的低角度散射光测定细胞的大小信息，并采用测定角度为 8-20 度的高角度散射光测定细胞的形态信息。结果如图 4 所示，白细胞被分成淋巴细胞、单核细胞、嗜酸细胞及中性粒细胞+嗜碱细胞四类。

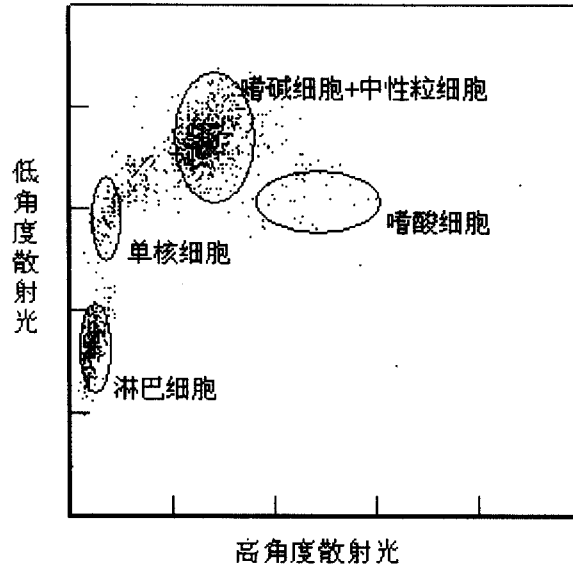


图 1

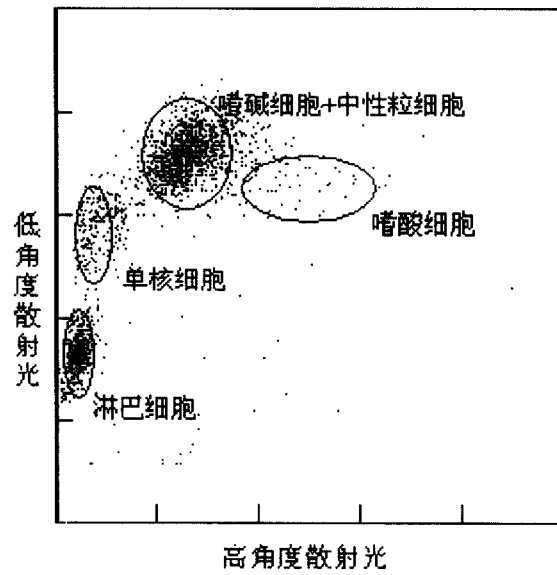


图 2

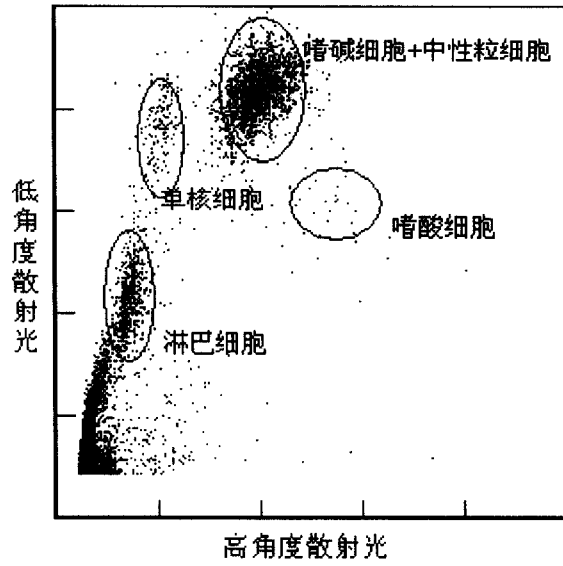


图 3

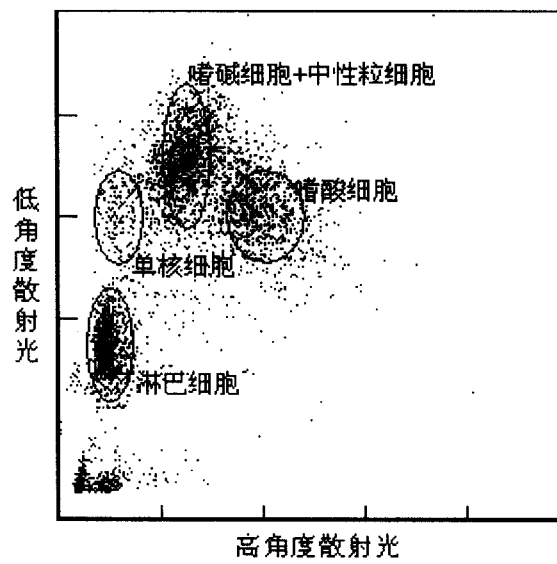


图 4

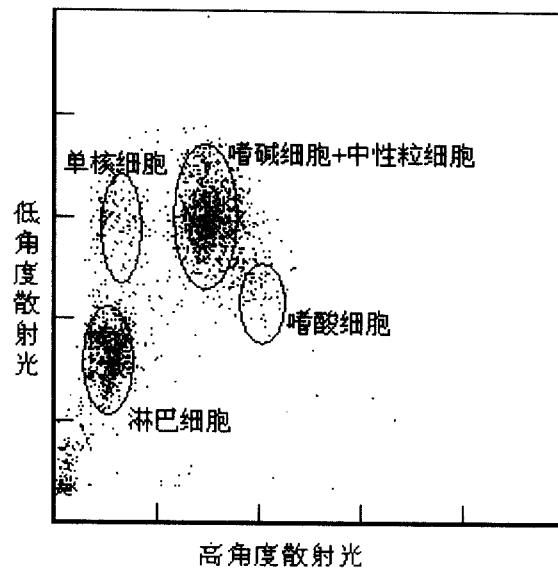


图 5

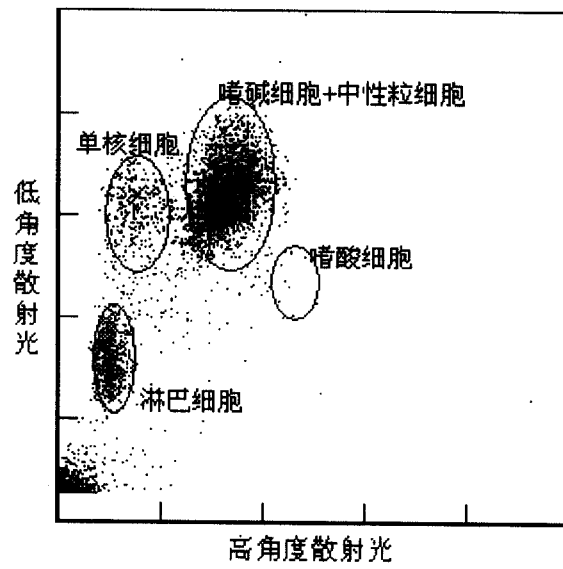


图 6

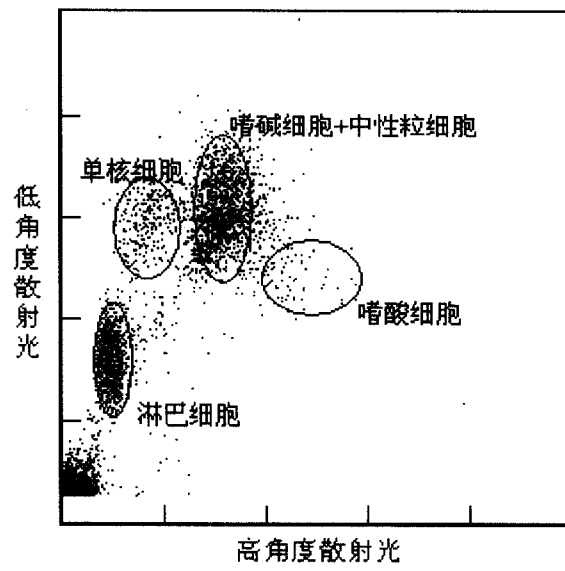


图 7