

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104981692 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 14

(21) 申请号 201380072181. 2

(22) 申请日 2013. 12. 20

(30) 优先权数据

61/777,966 2013. 03. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/077175 2013. 12. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/143332 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 雅培实验室

地址 美国伊利诺斯

(72) 发明人 吴炯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 崔锡强

(51) Int. Cl.

G01N 33/50(2006. 01)

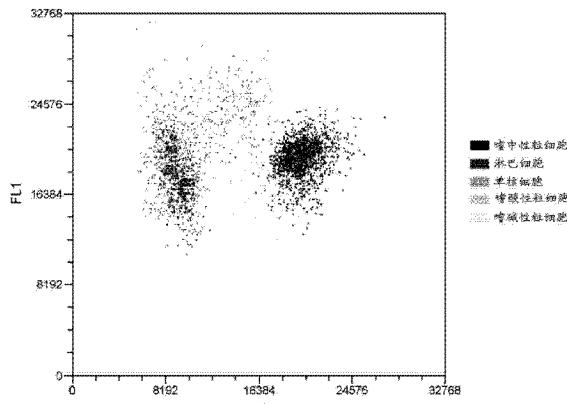
权利要求书4页 说明书15页 附图32页

(54) 发明名称

用于分析白细胞的试剂、体系及方法

(57) 摘要

本发明的各方面包括可以用于分析全血样品以鉴定、分类和/或定量样品中的白血球(WBC)和WBC亚群的WBC分析试剂、体系和方法。本发明的WBC分析试剂通常包括至少一种膜可渗透的荧光染料、WBC保护剂和表面活性剂。在一些实施方案中，所述WBC试剂包括适量的渗透压调节组分来调节所述WBC试剂的渗透压至所需的范围之内。



1. 一种使用自动血液分析仪进行白血细胞 (WBC) 分析的方法, 所述方法包括：
 - (a) 用 WBC 分析试剂稀释全血样品, 其中所述 WBC 分析试剂包含：
膜可渗透的荧光染料, 其标记所述样品中的多个含核细胞 ; 和
渗透压调节组分, 其当使用所述血液分析仪分析时将多个 WBC 亚群彼此分离 ;
 - (b) 在范围为约 30°C 至约 50°C 的温度下孵育步骤 (a) 的所述稀释血样小于约 25 秒的孵育时间 ;
 - (c) 将来自步骤 (b) 的经孵育的样品递送至所述血液分析仪的流动池 ;
 - (d) 当来自步骤 (c) 的经孵育的样品穿过所述流动池时, 使用激发源将所述样品激发 ;
 - (e) 收集来自所述被激发的样品的多个光散射信号和至少一个荧光发射信号 ; 和
 - (f) 基于在步骤 (e) 中收集的所有所述信号进行 WBC 差异分析, 同时基于所述至少一个荧光发射信号排除对所述稀释血样内的不满足荧光阈值的任何颗粒的考虑。
2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述激发源具有约 350nm 至约 700nm 的波长。
3. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述荧光发射信号通过带通滤光器或长通滤光器在约 360nm 至约 750nm 的波长下收集。
4. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述膜可渗透的荧光染料为吖啶橙、碘化己锭、SYTO RNA Select、SYTO 12 或 SYTO 14。
5. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓度范围为约 0.0001% 至约 0.0005%。
6. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓度为约 0.01 μM 至约 15 μM。
7. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述渗透压调节组分为氯化铵或氯化钠。
8. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述渗透压调节组分的浓度范围为约 0.1% 至约 0.5%。
9. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述试剂还包含 WBC 保护剂。
10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中所述 WBC 保护剂为甲醛、戊二醛、丁氧基乙醇、苯氧基乙醇或异丙醇。
11. 根据权利要求 9 或 10 所述的方法, 其中所述 WBC 保护剂的浓度范围为约 0.1% 至约 1.0%。
12. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述 WBC 分析试剂还包含表面活性剂。
13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述表面活性剂为皂角昔。
14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法, 其中所述表面活性剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.05%。
15. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述试剂还包含 pH 缓冲组分。
16. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述 pH 缓冲组分为醋酸钠或碳酸氢钠。
17. 根据权利要求 15 或 16 所述的方法, 其中所述 pH 缓冲组分的浓度范围为约 0.01% 至约 0.5%。
18. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述试剂还包含抗微生物剂。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中所述抗微生物剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.1%。

20. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述 WBC 分析试剂的 pH 范围为约 2.5 至约 12.5 pH 单位。

21. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法, 其中所述 WBC 分析试剂的渗透压范围为约 25 至约 350mOsm。

22. 一种用于对全血样品进行白血细胞 (WBC) 差异分析的体系, 所述体系包括 :

(a) 血液分析仪, 所述血液分析仪包括 :

激发源, 其被布置成激发所述血样中的颗粒;

多个检测器, 其包括 (1) 被布置成测量来自所述被激发的血样的轴向光损失的轴向光损失检测器、(2) 被布置成测量来自所述被激发的血样的中等角度散射的中等角度散射检测器、(3) 被布置成测量来自所述被激发的血样的大角度偏振侧向散射的偏振侧向散射检测器、(4) 被布置成测量来自所述被激发的血样的大角度消偏振侧向散射的消偏振侧向散射检测器、和 (5) 被布置成测量来自所述被激发的血样发射的荧光的荧光检测器; 和

处理器, 其被配置成 :

(I) 从所述多个检测器接收 (1) 轴向光损失、(2) 中等角度散射、(3) 大角度偏振侧向散射、(4) 大角度消偏振侧向散射和 (5) 荧光的测量结果, 和

(II) 基于所有五个测量结果, 针对发射高于荧光阈值的荧光的颗粒进行所述血样的 WBC 差异分析; 和

(b) 用于分析所述样品中 WBC 的试剂, 所述试剂包含 :

膜可渗透的荧光染料; 和

渗透压调节组分;

其中所述膜可渗透的荧光染料的浓度足以有助于使用所述血液分析仪鉴定含有细胞核的样品中的一种或多种细胞; 并且

其中所述渗透压调节组分的浓度足以有助于使用所述血液分析仪鉴定所述样品中的多个 WBC 亚群。

23. 根据权利要求 22 所述的体系, 其中所述膜可渗透的荧光染料为吖啶橙、碘化己啶、SYTO RNA Select、SYTO 12 或 SYTO 14。

24. 根据权利要求 22 或 23 所述的体系, 其中所述试剂中膜可渗透的荧光染料的浓度范围为约 0.0001% 至约 0.0005%。

25. 根据权利要求 22-24 中的任一项所述的体系, 其中所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓度范围为约 0.01 μM 至约 15 μM。

26. 根据权利要求 22-25 中的任一项所述的体系, 其中所述渗透压调节组分为氯化铵或氯化钠。

27. 根据权利要求 22-26 中的任一项所述的体系, 其中所述渗透压调节组分的浓度范围为约 0.1% 至约 0.5%。

28. 根据权利要求 22-27 中的任一项所述的体系, 其中所述试剂还包含 WBC 保护剂。

29. 根据权利要求 28 所述的体系, 其中所述 WBC 保护剂为甲醛、戊二醛、丁氧基乙醇、苯氧基乙醇或异丙醇。

30. 根据权利要求 28 或 29 所述的体系, 其中所述 WBC 保护剂的浓度范围为约 0.1% 至约 1.0%。
31. 根据权利要求 22-30 中的任一项所述的体系, 其中所述试剂还包含表面活性剂。
32. 根据权利要求 31 所述的体系, 其中所述表面活性剂为皂角苷。
33. 根据权利要求 31 或 32 所述的体系, 其中所述表面活性剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.05%。
34. 根据权利要求 22-33 中的任一项所述的体系, 其中所述试剂还包括 pH 缓冲组分。
35. 根据权利要求 34 所述的体系, 其中所述 pH 缓冲组分为醋酸钠或碳酸氢钠。
36. 根据权利要求 34 或 35 所述的体系, 其中所述 pH 缓冲组分的浓度范围为约 0.01% 至约 0.5%。
37. 根据权利要求 22-36 中的任一项所述的体系, 其中所述试剂还包含抗微生物剂。
38. 根据权利要求 37 所述的体系, 其中所述抗微生物剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.1%。
39. 根据权利要求 22-38 中的任一项所述的体系, 其中所述试剂的 pH 范围为约 2.5 至约 12.5pH 单位。
40. 根据权利要求 22-39 中的任一项所述的体系, 其中所述试剂的渗透压范围为约 25 至约 350mOsm。
41. 根据权利要求 22-40 中的任一项所述的体系, 其中所述处理器被进一步配置成预筛选所接收的测量结果以排除对不满足所述荧光阈值的颗粒的考虑。
42. 根据权利要求 22-41 中的任一项所述的体系, 其中所述轴向光损失检测器测量在 0° 散射处的轴向光损失。
43. 根据权利要求 22-42 中的任一项所述的体系, 其中所述中等角度散射检测器测量在约 3° 至约 15° 处的光角散射。
44. 根据权利要求 22-43 中的任一项所述的体系, 其中所述多个检测器包括一个或多个光电倍增管。
45. 根据权利要求 22-44 中的任一项所述的体系, 其中所述激发源是激光器。
46. 根据权利要求 45 所述的体系, 其中所述激光器在对应于所述荧光染料的波长下发射光。
47. 根据权利要求 22-46 中的任一项所述的体系, 其中选择所述荧光染料以与所述激发源相对应。
48. 根据权利要求 22-47 中的任一项所述的体系, 其还包括用于用所述试剂稀释所述血样的孵育子体系。
49. 根据权利要求 48 所述的体系, 其中所述孵育子体系被配置成用所述试剂孵育所述血样少于约 25 秒的时间段。
50. 根据权利要求 48 或 49 所述的体系, 其中所述孵育子体系被配置成用所述试剂孵育所述血样少于约 17 秒的时间段。
51. 根据权利要求 48-50 中的任一项所述的体系, 其中所述孵育子体系被配置成用所述试剂孵育所述血样少于约 9 秒的时间段。
52. 根据权利要求 48-51 中的任一项所述的体系, 其中所述孵育子体系被配置成在范

围为约 30℃至约 50℃的温度下用所述试剂孵育所述血样。

53. 根据权利要求 48-52 中的任一项所述的体系，其中所述孵育子体系被配置成在约 40℃的温度下用所述试剂孵育所述血样。

54. 一种使用血液分析仪分析全血样品中的白血细胞 (WBC) 的试剂，所述试剂包含：

足以有助于使用所述血液分析仪鉴定所述含有细胞核的样品中多个细胞的浓度的膜可渗透的荧光染料；和

足以有助于使用所述血液分析仪鉴定所述样品中的多个 WBC 亚群的浓度的渗透压调节组分。

55. 根据权利要求 54 所述的试剂，其中所述膜可渗透的荧光染料为吖啶橙、碘化己锭、SYTO RNA Select、SYTO 12 或 SYTO 14。

56. 根据权利要求 54 或 55 所述的试剂，其中所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓度范围为约 0.0001% 至约 0.0005%。

57. 根据权利要求 54-56 中的任一项所述的试剂，其中所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓度范围为约 0.01 μM 至约 15 μM。

58. 根据权利要求 54-57 中的任一项所述的试剂，其中所述渗透压调节组分为氯化铵或氯化钠。

59. 根据权利要求 54-58 中的任一项所述的试剂，其中所述渗透压调节组分的浓度范围为约 0.1% 至约 0.5%。

60. 根据权利要求 54-59 中的任一项所述的试剂，其中所述试剂还包含 WBC 保护剂。

61. 根据权利要求 60 所述的试剂，其中所述 WBC 保护剂为甲醛、戊二醛、丁氧基乙醇、苯氧基乙醇或异丙醇。

62. 根据权利要求 60 或 61 所述的试剂，其中所述 WBC 保护剂的浓度范围为约 0.1% 至约 1.0%。

63. 根据权利要求 54-62 中的任一项所述的试剂，其中所述 WBC 分析试剂还包含表面活性剂。

64. 根据权利要求 63 所述的试剂，其中所述表面活性剂为皂角苷。

65. 根据权利要求 63 或 64 所述的试剂，其中所述表面活性剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.05%。

66. 根据权利要求 54-65 中的任一项所述的试剂，其中所述试剂还包括 pH 缓冲组分。

67. 根据权利要求 66 所述的试剂，其中所述 pH 缓冲组分为醋酸钠或碳酸氢钠。

68. 根据权利要求 66 或 67 所述的试剂，其中所述 pH 缓冲组分的浓度范围为约 0.01% 至约 0.5%。

69. 根据权利要求 54-68 中的任一项所述的试剂，其中所述试剂还包含抗微生物剂。

70. 根据权利要求 69 所述的试剂，其中所述抗微生物剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.1%。

71. 根据权利要求 54-70 中的任一项所述的试剂，其中所述 WBC 分析试剂的 pH 范围为约 2.5 至约 12.5pH 单位。

72. 根据权利要求 54-71 中的任一项所述的试剂，其中所述 WBC 分析试剂的渗透压范围为约 25 至约 350mOsm。

用于分析白细胞的试剂、体系及方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 12 日提交的美国临时专利申请第 61/777,966 号的权益，该申请通过引用整体并入本文。

[0003] 背景

[0004] 使用自动血液分析仪精确计数并分类全血样品中的白细胞 (WBC) 是一个重要的诊断过程。通常，通过同时裂解全血样品中的红细胞 (RBC, 红血球 (erythrocyte)) 并保存全血样品中的 WBC 来实现 WBC 分析。现代血液分析仪中通常需要一种或多种 WBC 试剂来进行这些功能并有助于 WBC 的分析。

[0005] WBC 计数和差异化的质量高度依赖于用来进行该分析的方法和相关试剂。配制稳健的 WBC 分析试剂仍是血液学行业的最大挑战之一。原则上，稳健的 WBC 试剂导致准确的 WBC 分析。理想地，精心配制的 WBC 试剂应有助于 (1) 在标准条件下彻底裂解红细胞 (RBC)，通常在约 30 秒或更少的时间框架中；(2) 将大的红细胞片段破坏或溶解成较小的块；和 (3) 保护来自 RBC 裂解工艺的 WBC，使得 WBC 能够被精确地计数并适当地分类。

[0006] 如果血样不能充分裂解，那么未裂解的 RBC（即使是非常小的百分比或浓度）或较大的 RBC 片段能够干扰 WBC 分析，因为使用传统的 WBC 分析技术难以从淋巴细胞（最小的 WBC）中分离或区分 RBC 或较大的 RBC。如果血液样本被过度裂解，那么通过过度损坏 WBC 的细胞膜会大大影响 WBC 的分类。因此，需要能够实现这些目标的改善的 WBC 的分析试剂、体系和方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本公开的各方面包括可以用于分析全血样品以鉴定、分类和 / 或定量样品中的白血球 (WBC) 和 WBC 亚群的 WBC 分析试剂、体系和方法。本发明的 WBC 分析试剂通常包括至少一种膜可渗透的荧光染料、WBC 保护剂和表面活性剂。在一些实施方案中，所述 WBC 试剂包括适量的渗透压调节组分来调节所述 WBC 试剂的渗透压至所需的范围之内。

[0009] 在一些实施方案中，本公开提供了使用自动血液分析仪进行白血细胞 (WBC) 分析的方法，所述方法包括：(a) 用 WBC 分析试剂稀释全血样品，其中所述 WBC 分析试剂包含：标记样品中的多个含核细胞的膜可渗透的荧光染料；和当使用血液分析仪分析时将多个 WBC 亚群彼此分离的渗透压调节组分；(b) 在范围为约 30°C 至约 50°C 的温度下孵育步骤 (a) 的稀释血样小于约 25 秒的孵育时间；(c) 将来自步骤 (b) 的经孵育的样品递送至血液分析仪的流动池；(d) 当来自步骤 (c) 的经孵育的样品穿过流动池时，使用激发源将所述样品激发；(e) 收集来自被激发的样品的多个光散射信号和至少一个荧光发射信号；和 (f) 进行基于在步骤 (e) 中收集的所有信号的 WBC 差异分析，同时基于所述至少一个荧光发射信号排除对所述稀释血样内的不满足荧光阈值的任何颗粒的考虑。

[0010] 在一些实施方案中，所述激发源具有约 350nm 至约 700nm 的波长。在一些实施方案中，所述荧光发射信号通过带通滤光器或长通滤光器在约 360nm 至约 750nm 的波长下收集。在一些实施方案中，所述试剂中的膜可渗透的荧光染料为吖啶橙、碘化己啶、SYTO RNA Select、SYTO 12 或 SYTO 14。在一些实施方案中，所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓

度范围为约 0.0001% 至约 0.0005%。在一些实施方案中，所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓度为约 0.01 μM 至约 15 μM。在一些实施方案中，所述渗透压调节组分为氯化铵或氯化钠。在一些实施方案中，所述渗透压调节组分的浓度范围为约 0.1% 至约 0.5%。在一些实施方案中，所述试剂还包含 WBC 保护剂。在一些实施方案中，所述 WBC 保护剂为甲醛、戊二醛、丁氧基乙醇、苯氧基乙醇或异丙醇。在一些实施方案中，所述 WBC 保护剂的浓度范围为约 0.1% 至约 1.0%。在一些实施方案中，所述 WBC 分析试剂还包含表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂为皂角苷。在一些实施方案中，所述表面活性剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.05%。在一些实施方案中，所述试剂还包括 pH 缓冲组分。在一些实施方案中，所述 pH 缓冲组分为醋酸钠或碳酸氢钠。在一些实施方案中，所述 pH 缓冲组分的浓度范围为约 0.01% 至约 0.5%。在一些实施方案中，所述试剂还包含抗微生物剂。在一些实施方案中，所述抗微生物剂为 proclin。在一些实施方案中，所述抗微生物剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.1%。在一些实施方案中，所述 WBC 分析试剂的 pH 范围为约 2.5 至约 12.5 pH 单位。在一些实施方案中，所述 WBC 分析试剂的渗透压范围为约 25 至约 350mOsm。

[0011] 在一些实施方案中，本公开提供了用于对全血样品进行白血细胞 (WBC) 差异分析的体系，所述体系包括：(a) 血液分析仪，所述血液分析仪包括：被布置成激发血样中颗粒的激发源；多个检测器，包括 (1) 被布置成测量来自被激发的血样的轴向光损失的轴向光损失检测器、(2) 被布置成测量来自被激发的血样的中等角度散射的中等角度散射检测器、(3) 被布置成测量来自被激发的血样的大角度偏振侧向散射的偏振侧向散射检测器、(4) 被布置成测量来自被激发的血样的大角度消偏振侧向散射的消偏振侧向散射检测器和 (5) 被布置成测量自被激发的血样发射的荧光的荧光检测器；和处理器，其被配置成：(I) 从多个检测器接收 (1) 轴向光损失、(2) 中等角度散射、(3) 大角度偏振侧向散射、(4) 大角度消偏振侧向散射和 (5) 荧光的测量结果，以及 (II) 基于所有五个测量，针对发射高于荧光阈值的荧光的颗粒进行血样的 WBC 差异分析；和 (b) 用于分析所述样品中 WBC 的试剂，所述试剂包含：膜可渗透的荧光染料；和渗透压调节组分；其中所述膜可渗透的荧光染料的浓度足以有助于使用所述血液分析仪鉴定含有细胞核的样品中的一种或多种细胞；并且其中所述渗透压调节组分的浓度足以有助于使用所述血液分析仪鉴定样品中的多个 WBC 亚群。

[0012] 在一些实施方案中，所述膜可渗透的荧光染料为吖啶橙、碘化己啶、SYTO RNA Select、SYTO 12 或 SYTO 14。在一些实施方案中，所述试剂中膜可渗透的荧光染料的浓度范围为约 0.0001% 至约 0.0005%。在一些实施方案中，所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓度范围为约 0.01 μM 至约 15 μM。在一些实施方案中，所述渗透压调节组分为氯化铵或氯化钠。在一些实施方案中，所述渗透压调节组分的浓度范围为约 0.1% 至约 0.5%。在一些实施方案中，所述试剂还包含 WBC 保护剂。在一些实施方案中，所述 WBC 保护剂为甲醛、戊二醛、丁氧基乙醇、苯氧基乙醇或异丙醇。在一些实施方案中，所述 WBC 保护剂的浓度范围为约 0.1% 至约 1.0%。在一些实施方案中，所述 WBC 分析试剂还包含表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂为皂角苷。在一些实施方案中，所述表面活性剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.05%。在一些实施方案中，所述试剂还包括 pH 缓冲组分。在一些实施方案中，所述 pH 缓冲组分为醋酸钠或碳酸氢钠。在一些实施方案中，所述 pH 缓冲组分的浓度范围为约 0.01% 至约 0.5%。在一些实施方案中，所述试剂还包含抗微生物剂。在一些实施方案中，所述抗微生物剂为 proclin。在一些实施方案中，所述抗微生物剂的浓度范围

为约 0.01% 至约 0.1%。在一些实施方案中，所述试剂的 pH 范围为约 2.5 至约 12.5pH 单位。在一些实施方案中，所述试剂的渗透压范围为约 25 至约 350mOsm。

[0013] 在一些实施方案中，所述处理器被进一步配置成预筛选所接收的测量结果以排除对不满足荧光阈值的颗粒的考虑。在一些实施方案中，轴向光损失检测器测量在 0° 散射处的轴向光损失。在一些实施方案中，中等角度散射检测器测量在约 3° 至约 15° 处的光角散射。在一些实施方案中，所述多个检测器包括一个或多个光电倍增管。在一些实施方案中，激发源是激光器。在一些实施方案中，激光器在对应于荧光染料的波长下发射光。在一些实施方案中，选择荧光染料以与激发源相对应。

[0014] 在一些实施方案中，所述体系还包括用于用所述试剂稀释血样的孵育子体系 (subsystem)。在一些实施方案中，所述孵育子体系被配置成用所述试剂孵育血样少于约 25 秒的时间段。在一些实施方案中，所述孵育子体系被配置成用所述试剂孵育血样少于约 17 秒的时间段。在一些实施方案中，所述孵育子体系被配置成用所述试剂孵育血样少于约 9 秒的时间段。在一些实施方案中，所述孵育子体系被配置成在范围为约 30°C 至约 50°C 的温度下用所述试剂孵育血样。在一些实施方案中，所述孵育子体系被配置成在约 40°C 的温度下用所述试剂孵育血样。

[0015] 在一些实施方案中，本公开提供了用于使用血液分析仪分析全血样品中的白血细胞 (WBC) 的试剂，所述试剂包含：足以有助于使用所述血液分析仪鉴定含有细胞核的样品中多个细胞的浓度的膜可渗透的荧光染料；和足以有助于使用所述血液分析仪鉴定样品中的多个 WBC 亚群的浓度的渗透压调节组分。

[0016] 在一些实施方案中，所述膜可渗透的荧光染料为吖啶橙、碘化己啶、SYTO RNA Select、SYTO 12 或 SYTO 14。在一些实施方案中，所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓度范围为约 0.0001% 至约 0.0005%。在一些实施方案中，所述试剂中的膜可渗透的荧光染料的浓度范围为约 0.01 μM 至约 15 μM。在一些实施方案中，所述渗透压调节组分为氯化铵或氯化钠。在一些实施方案中，所述渗透压调节组分的浓度范围为约 0.1% 至约 0.5%。在一些实施方案中，所述试剂还包含 WBC 保护剂。在一些实施方案中，所述 WBC 保护剂为甲醛、戊二醛、丁氧基乙醇、苯氧基乙醇或异丙醇。在一些实施方案中，所述 WBC 保护剂的浓度范围为约 0.1% 至约 1.0%。在一些实施方案中，所述 WBC 分析试剂还包含表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂为皂角苷。在一些实施方案中，所述表面活性剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.05%。

[0017] 在一些实施方案中，所述试剂还包括 pH 缓冲组分。在一些实施方案中，所述 pH 缓冲组分为醋酸钠或碳酸氢钠。在一些实施方案中，所述 pH 缓冲组分的浓度范围为约 0.01% 至约 0.5%。在一些实施方案中，所述试剂还包含抗微生物剂。在一些实施方案中，所述抗微生物剂为 proclin。在一些实施方案中，所述抗微生物剂的浓度范围为约 0.01% 至约 0.1%。在一些实施方案中，所述 WBC 分析试剂的 pH 范围为约 2.5 至约 12.5pH 单位。在一些实施方案中，所述 WBC 分析试剂试剂的渗透压范围为约 25 至约 350mOsm。

附图说明

[0018] 并入本文的附图形成了说明书的部分。结合此书面说明书，附图还起到解释本文所述的试剂、体系和方法的原理，并使本领域技术人员能够配制并使用本文所述的试剂、体

系和方法。附图中,相似的附图标记表示相同或功能相似的元素。

[0019] 图 1 示出了使用含有 $3.8 \mu M$ 吲啶橙作为荧光染料的 WBC 分析试剂得到的 WBC 散点图 (FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0020] 图 2 示出了使用含有 $1.3 \mu M$ 碘化己啶作为荧光染料的 WBC 分析试剂得到的 WBC 散点图 (FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0021] 图 3 示出了使用含有 $1.3 \mu M$ SYTO RNA Select 作为荧光染料的 WBC 分析试剂得到的 WBC 散点图 (FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0022] 图 4 示出了使用含有 $1.3 \mu M$ SYTO 12 作为荧光染料的 WBC 分析试剂得到的 WBC 散点图 (FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0023] 图 5 示出了使用含有 $1.3 \mu M$ SYTO 14 作为荧光染料的 WBC 分析试剂得到的 WBC 散点图 (FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0024] 图 6A 示出了使用含有 $11.3 \mu M(1X)$ 的浓度的吖啶橙作为荧光染料的 WBC 分析试剂得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0025] 图 6B 示出了使用含有 $1.13 \mu M(0.1X)$ 的浓度的吖啶橙作为荧光染料的 WBC 分析试剂得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0026] 图 6C 示出了使用含有 $0.11 \mu M(0.01X)$ 的浓度的吖啶橙作为荧光染料的 WBC 分析试剂得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0027] 图 6D 示出了使用含有 $0.022 \mu M(0.002X)$ 的浓度的吖啶橙作为荧光染料的 WBC 分析试剂得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0028] 图 7A 示出了使用含有 0.22% 甲醛的 WBC 分析试剂 (与实施例 WBC 分析试剂 #1 相同的配制物) 得到的两幅 WBC 散点图 (ALL 对 IAS 和 FL1 对 ALL)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0029] 图 7B 示出了使用含有 0.22% 甲醛的 WBC 分析试剂 (与实施例 WBC 分析试剂 #1 相同的配制物) 得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0030] 图 7C 示出了使用含有 0.22% 甲醛的 WBC 分析试剂 (与实施例 WBC 分析试剂 #1 相同的配制物) 得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 IAS 和 FL1 对 PSS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0031] 图 8A 示出了使用含有 0.2% 戊二醛的 WBC 分析试剂 (与实施例 WBC 分析试剂 #6 相同的配制物) 得到的两幅 WBC 散点图 (ALL 对 IAS 和 FL1 对 ALL)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸

性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0032] 图 8B 示出了使用含有 0.2% 戊二醛的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #6 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0033] 图 8C 示出了使用含有 0.2% 戊二醛的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #6 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 IAS 和 FL1 对 PSS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0034] 图 9A 示出了使用含有 0.5% 丁氧基乙醇的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #7 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (ALL 对 IAS 和 FL1 对 ALL)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0035] 图 9B 示出了使用含有 0.5% 丁氧基乙醇的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #7 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0036] 图 9C 示出了使用含有 0.5% 丁氧基乙醇的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #7 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 IAS 和 FL1 对 PSS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0037] 图 10A 示出了使用含有 0.5% 苯氧基乙醇的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #8 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (ALL 对 IAS 和 FL1 对 ALL)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0038] 图 10B 示出了使用含有 0.5% 苯氧基乙醇的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #8 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0039] 图 10C 示出了使用含有 0.5% 苯氧基乙醇的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #8 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 IAS 和 FL1 对 PSS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0040] 图 11A 示出了使用含有 0.5% 异丙醇的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #9 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (ALL 对 IAS 和 FL1 对 ALL)。嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0041] 图 11B 示出了使用含有 0.5% 异丙醇的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #9 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0042] 图 11C 示出了使用含有 0.5% 异丙醇的 WBC 分析试剂（与实施例 WBC 分析试剂 #9 相同的配制物）得到的两幅 WBC 散点图 (PSS 对 IAS 和 FL1 对 PSS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0043] 图 12A 示出了使用含有 0.5% 氯化铵作为渗透压调节组分的 WBC 分析试剂得到的三幅 WBC 散点图 (ALL 对 IAS、PSS 对 ALL 和 PSS 对 IAS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0044] 图 12B 示出了使用含有 0.375% 氯化铵作为渗透压调节组分的 WBC 分析试剂得到的三幅 WBC 散点图 (ALL 对 IAS、PSS 对 ALL 和 PSS 对 IAS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、

淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0045] 图12C示出了使用含有0.25%氯化铵作为渗透压调节组分的WBC分析试剂得到的三幅WBC散点图(ALL对IAS、PSS对ALL和PSS对IAS)。嗜中性粒细胞/嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0046] 图12D示出了使用含有0.125%氯化铵作为渗透压调节组分的WBC分析试剂得到的三幅WBC散点图(ALL对IAS、PSS对ALL和PSS对IAS)。嗜中性粒细胞/嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。图12A-12D之间的比较示出了由散点图上WBC亚群的位置偏移得到的WBC分析试剂中氯化铵的浓度变化。

[0047] 图13,小图A-E示出了使用含有不同浓度的氯化钠的WBC试剂得到的WBC散点图(ALL对IAS)。小图A:不添加NaCl;小图B:+0.033%NaCl;小图C:+0.066%NaCl;小图D:+0.100%NaCl;小图E:+0.133%NaCl。嗜中性粒细胞/嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。

[0048] 图14为图示出适用于血液学分析的设备(包括流式细胞仪)的照明和检测光学器件的示意图。

[0049] 详述

[0050] 本发明的各方面包括可以用于分析全血样品以鉴定、分类和/或定量样品中的白血球(WBC)和WBC亚群的WBC分析试剂、体系和方法。本公开的WBC分析试剂通常包括至少一种膜可渗透的荧光染料、WBC保护剂和表面活性剂。在一些实施方案中,所述WBC试剂包括适量的渗透压调节组分来调节所述WBC试剂的渗透压至所需的范围之内。

[0051] 在一些方面中,本文所公开的试剂、体系和方法被用来使用荧光染色和荧光触发策略筛选WBC。通过使用这种方法,来自未裂解的RBC(例如抗裂解的RBC,或“rstRBC”)和RBC片段的干扰被基本上或完全消除,因此,确保WBC和WBC亚群的精确计数和分类。本公开还提供了使用例如被配置成进行荧光触发方法的自动血液学分析仪有助于增强对WBC的分析的WBC分析试剂。本公开的WBC分析试剂也适用于分析含脆性淋巴细胞(或其它脆性WBC)的样品(包括老化的样品)。

[0052] 在一些实施方案中,例如,本文所公开的方法涉及:将血样与包括至少一种膜可渗透的荧光染料、WBC保护剂、表面活性剂和足以分离由血液分析仪生成的散点图上的WBC亚群的浓度的渗透压调节组分的WBC分析试剂接触;在升高的温度下孵育具有WBC分析试剂的血样;用荧光染料将血样染色;在血液分析仪上使用荧光触发器(fluorescence trigger)来筛选血样中的WBC;并且使用(1)轴向光损失、(2)中等角度散射、(3)大角度偏振侧向散射、(4)大角度消偏振侧向散射和(5)荧光发射的测量的组合来进行样品中WBC的差异分析(例如计数存在于样品中的多个WBC亚型或亚群中每一个的数目)。

[0053] 结合本文所述的荧光触发器分析方法使用本文所述的荧光染料通过筛选出未被WBC试剂裂解的RBC提供了WBC分析中的异常灵敏度。这反过来又有助于使用更温和的WBC分析试剂(例如,在裂解样品中的RBC的过程中不裂解或损坏WBC的分析试剂),其可被精确定调节以有助于使用例如渗透压调整组分进一步彼此分离多个WBC亚群(如由血液分析仪产生的一幅或多幅散点图上所观察)。

[0054] 如本文中所使用,术语“荧光信息”表示自血液分析仪的荧光通道收集的数据。如本文中所使用,术语“荧光通道”表示用于测量自样品发射的荧光量的设置在适当的波长带

处的检测装置,例如光电倍增管。

[0055] WBC 分析试剂

[0056] 本发明的各方面包括可以被用来增强使用自动血液分析仪分析血样中 WBC 和 WBC 亚群的 WBC 分析试剂。根据本发明的实施方案的 WBC 分析试剂通常被用来裂解血样中的 RBC, 同时保存血样中的 WBC 用于分析。当在由血液分析仪生成的差别散点图上观察时, 根据本发明的实施方案的 WBC 分析试剂还通常提供将 WBC 亚群增强地、无干扰地彼此分离。这种增强的分离有助于更精确地分析存在于血样中的多个 WBC 亚群。

[0057] 根据本发明的实施方案的 WBC 分析试剂可以通常包括至少一种膜可渗透的荧光染料、WBC 保护剂、表面活性剂、渗透压调节组分及几种附加组分。下面更详细地描述这些组分中的每一种。

[0058] 膜可渗透的荧光染料

[0059] 膜可渗透的荧光染料可以被用来区分两类血细胞;即含有 DNA 的血细胞和不含 DNA 的血细胞。由于 WBC 在它们的核中含有大量的 DNA, 而 RBC 不含, 所以包括与 DNA 相互作用的膜可渗透的荧光染料有助于区分 RBC 与 WBC。染料的目的是通过细胞膜, 以足够的亲和力结合至一个或多个核酸, 并且当染料被适当的光源激发时, 发射具有充足 Stokes 位移的荧光信号。为了适当地激发染料和达到最佳的结果, 染料在可见光带中的峰吸收基本上匹配光源的波长(在光源的 50nm 的波长内, 更优选在光源的 25nm 的波长内)。

[0060] 膜可渗透的荧光染料优选:1)能够结合至核酸(例如,DNA),2)能够穿透 WBC 的细胞膜,3)当经受光源照射时可在选择的波长处激发,4)在被光源激发时发射荧光,以及5)是生物稳定的并可溶于液体(例如水溶液)中。合适的膜可渗透的荧光染料的实例包括但不限于:吖啶橙、碘化己啶、SYTO 12、SYTO 14、SYTO RNA Select 或它们的任意等同物。

[0061] 基于配置在血液分析仪中的荧光触发器, 荧光染料通常被用来活化 WBC 并筛选出未裂解的 RBC 和 RBC 片段。在一些实施方案中, 染料以约 1pM 至约 1mM 的浓度存在, 这取决于结合亲和力、膜渗透特性和 / 或染料发射荧光的强度。在一些实施方案中, 染料以约 1pg/L 至约 1mg/L 的浓度存在, 这取决于结合亲和力、膜渗透特性和 / 或染料发射荧光的强度。尽管各种染料是可用的, 但所选择的染料一般与血液分析仪的激发源配对, 使得一种单一染料被用来在预期被鉴定、定量和 / 或分析的所有 WBC 亚群中染色并激发发射荧光。这样, 在一些实施方案中, 单一(即排他的)染料可以被用来鉴定、定量和分析同时存在于样品中的所有不同的 WBC 亚群。在一些实施方案中, 一种以上的荧光染料可被包括于 WBC 分析试剂中。

[0062] 在一些实施方案中, 荧光染料以约 1.0 μM、至约 1.3 μM、至约 1.5 μM、至约 1.8 μM 或至约 2.0 μM 或更高的浓度存在于 WBC 分析试剂中。在一些实施方案中, 荧光染料以约 0.0001%、至约 0.0002%、至约 0.0003%、至约 0.0004% 或至约 0.0005% 或更高的浓度存在于 WBC 分析试剂中。在某些实施方案中, 荧光染料以约 0.01 μM、至约 0.022 μM、至约 0.05 μM、至约 0.1 μM、至约 0.11 μM、至约 0.5 μM、至约 1.0 μM、至约 1.13 μM、至约 5.0 μM、至约 10 μM、至约 11.3 μM、至约 15 μM 或更高的浓度存在于 WBC 分析试剂中。

[0063] WBC 保护剂

[0064] 根据本发明的一些实施方案的 WBC 分析试剂可以包括在 RBC 裂解期间避免过度损伤 WBC 的 WBC 保护剂。WBC 保护剂的实例包括但不限于甲醛、戊二醛、丁氧基乙醇、苯氧基

乙醇、异丙醇或它们的组合。在一些实施方案中，WBC 保护剂以约 0.1%、至约 0.2%、至约 0.3%、至约 0.4%、至约 0.5%、至约 0.6%、至约 0.7%、至约 0.8%、至约 0.9% 或至约 1% 的浓度存在于 WBC 分析试剂中。

[0065] 渗透压调节组分

[0066] 根据本发明的一些实施方案的 WBC 分析试剂可以包括渗透压调节组分。渗透压调节组分通常是将 WBC 分析试剂的渗透压改变至所需程度的试剂。渗透压调节组分的实例包括但不限于：含阳离子的盐，例如含诸如 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的盐；含阴离子的盐，例如含诸如 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 HSO_4^- 、 PO_4^{3-} 、 HPo_4^{2-} 、 $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 COOH^- 和 CH_3COO^- 的盐；有机化合物，例如诸如糖（例如，葡萄糖和蔗糖）和醇（例如，乙醇和甲醇）；或它们的等同物。

[0067] 在一些实施方案中，渗透压调节组分以约 0.1% 或更高、至约 0.125% 或更高、至约 0.25% 或更高、至约 0.5% 或更高的浓度存在于 WBC 分析试剂中。

[0068] 附加组分

[0069] 除上文所述的组分之外，根据本发明的一些实施方案的 WBC 分析试剂也可以包括多种添加剂。例如，在一些实施方案中，WBC 分析试剂可以包括用来调节和 / 或保持溶液的 pH 并达到试剂的最佳渗透压的缓冲剂或盐。缓冲剂或盐的实例包括但不限于醋酸钠、碳酸氢钠或它们的组合。一些实施方案中，缓冲剂或盐以约 0.01%、至约 0.02%、至约 0.03%、至约 0.04%、至约 0.05%、至约 0.06%、至约 0.07%、至约 0.08%、至约 0.09%、至约 0.1%、至约 0.15%、至约 0.2%、至约 0.25%、至约 0.3%、至约 0.35%、至约 0.4%、至约 0.45%、至约 0.5% 或更高的浓度存在于 WBC 分析试剂中。

[0070] 在一些实施方案中，WBC 分析试剂可以具有从约 2.5pH 单位、至约 3.0pH 单位、至约 3.5pH 单位、至约 4.0pH 单位、至约 4.5pH 单位、至约 5.0pH 单位、至约 5.5pH 单位、至约 6.0pH 单位、至约 6.5pH 单位、至约 7.0pH 单位、至约 7.5pH 单位、至约 8.0pH 单位、至约 8.5pH 单位、至约 9.0pH 单位、至约 9.5pH 单位、至约 10.0pH 单位、至约 10.5pH 单位、至约 11pH 单位、至约 11.5pH 单位、至约 12pH 单位、至约 12.5pH 单位变化的 pH。

[0071] 在某些实施方案中，WBC 分析试剂也可以包括用来防止 WBC 分析试剂中微生物生长的抗微生物剂。抗微生物剂的实例包括但不限于 Proclins，例如 Proclin 300 或它的等同物。抗微生物剂的浓度通常足以使 WBC 分析试剂保持所需的保质期。在一些实施方案中，抗微生物剂可以以约 0.01%、至约 0.02%、至约 0.03%、至约 0.04%、至约 0.05%、至约 0.06%、至约 0.07%、至约 0.08%、至约 0.09% 或至约 0.1% 或更高的浓度存在于 WBC 分析试剂中。

[0072] 在一些实施方案中，WBC 分析试剂可以包括用来最小化 RBC 片段的蓄积并防止 RBC 片段干扰样品中 WBC 的分析的表面活性剂。表面活性剂的实例包括但不限于皂角苷或它的等同物。在一些实施方案中，表面活性剂可以以约 0.01%、至约 0.015%、至约 0.02%、至约 0.025%、至约 0.03%、至约 0.035%、至约 0.04%、至约 0.045%、至约 0.05% 或更高的浓度存在于 WBC 分析试剂中。

[0073] 在一些实施方案中，WBC 分析试剂可以包括 RBC 裂解组分。RBC 裂解组分通常可以帮助裂解血样中的 RBC，同时也促成 WBC 分析试剂的渗透压调节以有助于存在于样品中的不同类别的 WBC 的分离和 / 或分析。RBC 裂解组分的实例包括但不限于：铵盐，例如诸如氯

化铵 ; 叔铵盐 ; 季铵盐或它们的等同物。

[0074] WBC 分析试剂的制备方法

[0075] 在一些实施方案中, 使用两阶段制备方法制备 WBC 分析试剂以溶解膜可渗透的荧光染料。在第一步骤中, 将荧光染料溶解于合适的有机溶剂 (例如, DMSO) 中以产生含有合适的第一浓度的荧光染料的溶液。在第二步骤中, 将于有机溶剂中含有荧光染料的溶液与水溶剂混合以产生含有所需最终浓度的荧光染料的水性 WBC 分析试剂。在一些实施方案中, 所述水溶剂可以含有 WBC 分析试剂的附加组分。

[0076] 裂解血样中的 RBC 的方法

[0077] 根据本发明的实施方案的 WBC 分析试剂可以通常被用来裂解全血样品中的 RBC。可以在高于室温的温度 (例如约 30°C 至约 50°C 之间, 例如约 40°C) 下进行血样中 RBC 的裂解, 历时范围为约 5 秒至约 1 分钟的时间段。在一些实施方案中, 可以在相对短的量的时间 (例如, 小于约 25 秒、小于约 17 秒或甚至小于约 9 秒) 进行 RBC 的裂解, 接着将 WBC 分析试剂与血样混合。血样的体积与 WBC 分析试剂的体积的稀释比 (表示为“血样的体积 :WBC 分析试剂的体积”) 可以变化很大。在一些实施方案中, 血样的体积与 WBC 分析试剂的体积比的范围为约 1:10、至约 1:20、至约 1:30、至约 1:40、至约 1:50、至约 1:60、至约 1:70、至约 1:80、至约 1:90、至约 1:100 或更高。

[0078] 涉及荧光触发器的分析方法

[0079] 在光源激发荧光染料时血细胞发射不同幅度的荧光信号。荧光信号的幅度的差异部分由细胞中的核酸 (即 DNA) 的量造成。DNA 的量越大, 更高的荧光信号的可能性越大。荧光幅度的差异也由例如荧光染料穿透细胞膜的能力、荧光染料分子的尺寸、荧光染料和结合的核酸之间的结合动力学、荧光染料和核酸之间的结合亲和力及其它此类因素造成。

[0080] 成熟的 RBC 发射最小的荧光信号, 因为在成熟的 RBC 中没有 DNA。有核的红血球 (nRBC) 发射很强的荧光信号, 因为不仅 DNA 存在于 nRBC 的核内, 染色也更容易发生, 因为在裂解方法期间 nRBC 的膜被破坏。未裂解的 RBC 或 RBC 片段不发射荧光, 但是在某些情况下, 它们可以发射非常弱的自发荧光。

[0081] 这样, 本文中所提出的体系和方法使用荧光触发器和 WBC 分析试剂的组合来分析样品内的 WBC。例如, 荧光触发器 (通常设在来自 RBC 的信号和来自 WBC 的信号之间) 可以被用来分别收集来自 WBC 的信号以用于进一步分析。换言之, 使用荧光触发器允许将来自 RBC 的信号分离出, 或从分析中移除, 这通过消除来自 RBC 信号的干扰而有助于更精确地测量及分析样品中的 WBC 和 WBC 亚群。使用 FL1 或荧光触发器的实例示于图 1-5 中。图 1 是 FL1 对 IAS 的散点图, 其示出使用荧光触发器用于消除 RBC 的任意片段 (无核颗粒) 以及用于仅收集含核事件 (例如 WBC 和 / 或 nRBC)。在图 1 中, WBC 分析试剂中的荧光染料为吖啶橙, 荧光染料的浓度为 3.8 μM。使用含有吖啶橙作为荧光染料的 WBC 分析试剂 (甚至具有非常不同的染料浓度, 即 11.3 μM 至 0.022 μM, 如图 6 中所示) 并且适当设定的 FL1 触发器有助于通过在 FL1 上建立阈值水平来鉴定含核事件。因此, 只有在 FL1 触发器上方的事件 (例如, WBC 和 / 或 nRBC, 如果存在的话) 被捕获用于进一步分析。

[0082] 光学和荧光通道用于分析的用途

[0083] 本发明的各方面涉及光学和荧光通道用于分析血样中的 WBC 的用途。例如, 在一些实施方案中, 通过多角度偏振散射分离技术 (MAPSS) 的方式在荧光信息增强的情况下进

行 WBC 差异分析需要至少一个光电二极管、或至少一个光电倍增管、或至少一个光电二极管和至少一个光电倍增管二者来检测由每个血细胞散射的通过流动池的光。两个或更多个光电二极管被用于测量 ALL 信号（测量约 0° 散射）和 IAS 信号（测量低角度（例如约 3° 至约 15°）散射）。两个或更多个光电倍增管（或雪崩光电二极管）被用于测量大角度（例如，90°）PSS 信号和大角度（例如，90°）DSS 信号。需要附加的光电倍增管用于在适当的波长范围内的 FL1 测量，这取决于光源波长的选择。因此，在体系上捕获的每个事件展示出多种信息维度，例如 ALL、IAS（一个或更多通道）、PSS、DSS 和荧光（一个或更多通道）。来自这些检测通道的信息被用于进一步分析血细胞。

[0084] 图 14 为图示出适用于血液学分析的设备（包括流式细胞仪）的照明和检测光学器件的示意图。现在参考图 14，设备 10 包括光源 12、前镜 14 和后镜 16 用于光束弯曲、含有第一圆柱形透镜 20 和第二圆柱形透镜 22 的扩束模块 18、聚焦透镜 24、精细光束调节器 26、流动池 28、前向散射透镜 30、靶心检测器 32、第一光电倍增管 34、第二光电倍增管 36 和第三光电倍增管 38。靶心检测器 32 具有用于 0° 光散射的内检测器 32a 和用于 7° 光散射的外检测器 32b。图 14 中描述的设备仅是可以用来进行本文所述方法的设备的一个实例。

[0085] 在下面的讨论中，光源优选为激光器。但是，也可以使用其它光源，例如灯（例如汞、氙）。光源可以是垂直偏振的风冷 Coherent Cube 激光器，商业可购买自 Coherent, Inc., Santa Clara, CA。在一些实施方案中，可以使用具有范围为 350nm 至 700nm 的波长的激光。激光器的运行条件和现在与“CELL-DYN”自动血液分析仪使用的激光器基本上相似。

[0086] 可以在例如通过引用整体并入本文的美国专利第 5,631,165 号中，尤其是在第 41 栏第 32 行至第 43 栏第 11 行中找到涉及合适的自动血液分析仪的流动池、透镜、聚焦透镜、细光束调节机制和激光聚焦透镜的额外细节。图 14 中所示的前向光路体系包括球形平凸透镜 30 和位于透镜的后焦面内的双元件光电二极管检测器 32。在这样的构造中，双元件光电二极管检测器 32 中的每个点映射至来自移动通过流动池 28 的细胞的光的特定收集角。检测器 32 可以是能够检测轴向光损失 (ALL) 和中等角度前向散射 (IAS) 的靶心检测器。美国专利第 5,631,165 号在第 43 栏第 12-52 行描述了此检测器的多种替代方式。

[0087] 第一光电倍增管 34(PMT1) 测量消偏振的侧向散射 (DSS)。第二光电倍增管 36(PMT2) 测量消偏振的侧向散射 (PSS)，第三光电倍增管 38(PMT3) 测量 440nm 至 680nm 放出的荧光，取决于所选择的荧光染料和所使用的光源。光电倍增管在宽波长范围内收集荧光信号以增加信号的强度。侧向散射和荧光发射通过二色光束分离器 40 和 42 被引导至这些光电倍增管，其在所需波长下有效地传输和反射以使得有效检测。美国专利第 5,631,165 号在第 43 栏第 53 行至第 44 栏第 4 行描述了涉及光电倍增管的多种其它细节。

[0088] 当通过使用浸渍收集体系测量荧光时，在光电倍增管 34、36 和 38 处的灵敏度得以增强。浸渍收集体系借助于折射指数匹配层将第一透镜 30 光学地耦合至流动池 28，使得在宽角上收集光。美国专利第 5,631,165 号在第 44 栏第 5-31 行描述了这种光学体系的多种其它细节。

[0089] 冷凝器 44 是用于高分辨率显微镜中的具有足够用于受衍射限制的成像的像差校正的光学透镜体系。美国专利第 5,631,165 号在第 44 栏第 32-60 行描述了这种光学体系的多种其它细节。

[0090] 图 14 中所示的其它组件（即狭缝 46、场透镜 48 和第二狭缝 50）的功能描述于美

国专利第 5,631,165 号的第 44 栏第 63 行至第 45 栏第 26 行中。被插入到光电倍增管的光路中来改变所检测光的波长或偏振化或波长和偏振化两者的光学滤光器 52 或 56 和偏振器 52 或 56 也描述于美国专利第 5,631,165 号的第 44 栏第 63 行至第 45 样第 26 行中。适用于本文的光学滤光器包括带通滤光器和长通滤光器。

[0091] 光电倍增管 34、36 和 38 检测侧向散射（在轴线大致垂直于入射激光束的锥体中散射的光）或荧光（在入射激光束的波长不同的波长下从细胞发射的光）。

[0092] 尽管上文引用了美国专利第 5,631,165 号的选择部分，但美国专利第 5,631,165 号通过引用整体并入本文。

[0093] 除了从四个传统 MAPSS 通道 (ALL、IAS、PSS、DSS) 收集的信息，所述 FL1 通道进一步将细胞亚群彼此区分。来自所有的光学维度和荧光维度的结合的定量信息提供了增强的且更可靠的用于含有 WBC 的样品的差异分析。

[0094] 本文所述的方法增强了用于血液学分析仪的 WBC 分析，并提供了更精确的 WBC 计数和更准确的 WBC 亚群的分类，因为基本上消除了来自未裂解的 RBC 和 RBC 片段的干扰。使用荧光提供了进一步的信息来改善 WBC 的差异分析。本文所述的方法在分析具有 rstrRBC 的样品和具有脆性 WBC 的样品时表现出相比于传统方法的优势。

[0095] 实施例 WBC 分析试剂配制物：

[0096] 下文提供 WBC 分析试剂配制物的各种实施例。下文提供的配制物仅用作实例，并且决不限制。本文所述组分的任意多种组合都可以被用于根据本发明的实施方案的 WBC 分析试剂中。

[0097] 实施例配制物 1：

[0098]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	0.250%
甲醛	0.220%
吖啶橙	3.8 μM

[0099] 实施例配制物 2：

[0100]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	0.250%
甲醛	0.220%
碘化己啶	1.3 μM

[0101] 实施例配制物 3：

[0102]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	0.250%
甲醛	0.220%
SYTO RNA Select	1.3 μM

[0103] 实施例配制物 4 :

[0104]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	0.250%
甲醛	0.220%
SYTO 12	1.3 μM

[0105] 实施例配制物 5 :

[0106]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	0.250%
甲醛	0.220%
SYTO 14	1.3 μM

[0107] 实施例配制物 6 :

[0108]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	0.250%
戊二醛	0.200%
吖啶橙	0.0003%

[0109] 实施例配制物 7 :

[0110]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	0.250%
丁氧基乙醇	0.500%
吖啶橙	0.0003%

[0111] 实施例配制物 8 :

[0112]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	0.250%
苯氧基乙醇	0.500%
吖啶橙	0.0003%

[0113] 实施例配制物 9 :

[0114]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	0.250%
异丙醇	0.500%
吖啶橙	0.0003%

[0115] 实施例配制物 10 :

[0116]

组分	浓度
醋酸钠	0.152%
碳酸氢钠	0.203%
皂角昔	0.014%
Proclin 300	0.060%
氯化铵	变化的, 0.125%-0.5%
甲醛	0.220%
吖啶橙	0.0003%

[0117] 实施例配制物 11 :

[0118]

组分	A	B	C	D	E
醋酸钠	0.152%	0.152%	0.152%	0.152%	0.152%
碳酸氢钠	0.203%	0.203%	0.203%	0.203%	0.203%
皂角昔	0.014%	0.014%	0.014%	0.014%	0.014%
Proclin 300	0.060%	0.060%	0.060%	0.060%	0.060%
氯化铵	0.125%	0.125%	0.125%	0.125%	0.125%
氯化钠	无	0.033%	0.066%	0.100%	0.133%
甲醛	0.220%	0.220%	0.220%	0.220%	0.220%
吖啶橙	0.0003%	0.0003%	0.0003%	0.0003%	0.0003%
渗透压(mOsm)	149	158	168	181	191

实施例：

[0119] 图 1-5 示出了分别使用上文实施例配制物 1-5 中所述的 WBC 分析试剂和体系进行分析的正常全血样本的 WBC 差异散点图 (FL1 对 IAS)。如图 1-5 中可见, WBC 分析试剂能够充分地区分并区别样品中的 WBC。

[0120] 图 6A-6D 示出了四种不同的 WBC 分析试剂配制物的 WBC 差异散点图 (PSS 对 ALL 和 FL1 对 IAS)。结果表明, 即使当 WBC 分析试剂中的膜可渗透荧光染料的浓度显著变化时, 也会获得相似的 WBC 差异。所测试的四种配制物与实施例配制物 1 中的那些相似, 除了吖啶橙的浓度以 11.3 μM(1X)、1.13 μM(0.1X)、0.11 μM(0.01X) 和 0.022 μM(0.002X) 制备, 其中 FL1PMT 的电压分别设定在 375V、420V、475V 和 520V。

[0121] 图 7A-7C 示出了使用含有 0.22% 甲醛作为 WBC 保护剂的 WBC 分析试剂 (与实施例配制物 1 相同的配制物) 进行分析的正常全血样本的多种 WBC 差异散点图。

[0122] 图 8A-8C 示出了使用含有 0.2% 戊二醛作为 WBC 保护剂的 WBC 分析试剂 (与实施例配制物 6 相同的配制物) 进行分析的正常全血样本的各个 WBC 差异散点图。

[0123] 图 9A-9C 示出了使用含有 0.5% 丁氧基乙醇作为 WBC 保护剂的 WBC 分析试剂 (与实施例配制物 7 相同的配制物) 进行分析的正常全血样本的各个 WBC 差异散点图。

[0124] 图 10A-10C 示出了使用含有 0.5% 苯氧基乙醇作为 WBC 保护剂的 WBC 分析试剂 (与实施例配制物 8 相同的配制物) 进行分析的正常全血样本的各个 WBC 差异散点图。

[0125] 图 11A-11C 示出了使用含有 0.5% 异丙醇作为 WBC 保护剂的 WBC 分析试剂 (与实施例配制物 9 相同的配制物) 进行分析的正常全血样本的各个 WBC 差异散点图。

[0126] 图 12A-12D 示出了使用含有指定含量的氯化铵作为渗透压调节组分的 WBC 分析试剂得到的各个 WBC 差异散点图 (ALL 对 IAS、PSS 对 ALL 和 PSS 对 IAS)。嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞示于散点图中。WBC 分析试剂具有与实施例配制物 10 中使用的相同的配制物, 除了按指示调节氯化铵的浓度。WBC 分析试剂中氯化铵的浓度的变化导致散点图上 WBC 亚群的位置的偏移。例如, 氯化铵的浓度在 WBC 试剂中从 0.125% 至 0.5% 变化。由各种氯化铵浓度变化导致的渗透压变化影响 ALL 对 IAS 散点图中嗜中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞的相对位置。较低浓度的氯化铵和较低的渗透压在散点图上表现出“提升”嗜中性粒细胞群并为嗜碱性粒细胞创造空间。对于含有 0.5%、0.375%、0.25% 和 0.125% 氯化铵的 WBC 试剂, 测量的渗透压分别在 263、224、181 和 146mOsm。可以通过比较散点图看出嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞群的位置偏移。

[0127] 图 13 示出了由不同浓度的 NaCl (见实施例配制物 11) 导致的渗透压变化而造成的 WBC 群体的相对位移。在此实验中, 渗透压的范围为 149 至 181mOsm。

[0128] 为了说明和描述的目的, 已经呈示本发明的前面描述。不旨在穷举或将本发明限制至公开的精确形式。按照上述教导可以进行其它的修改和变化。为了最好地解释本发明的原理及它的实际应用且从而使本领域其它技术人员能够在适合于预期的特定用途的多种实施方案和多种变化中最好地利用本发明, 对实施方案进行选择并描述。随附的权利要求意在被解释为包括本发明的其它替代实施方案; 包括等效的结构、组分、方法和装置。

[0129] 上文的详述是指图示出一种或多种示例性实施方案的所附附图。其它实施方案也是可以的。可以对所描述的实施方案做出修改而不偏离本发明的精神和范围。因此, 详述不意指是限制性的。另外, 概述和摘要部分可以阐明发明人所设想的一个或多个但不是全部的本发明的示例性实施方案, 因此, 绝非意在限制本发明及随附的权利要求。

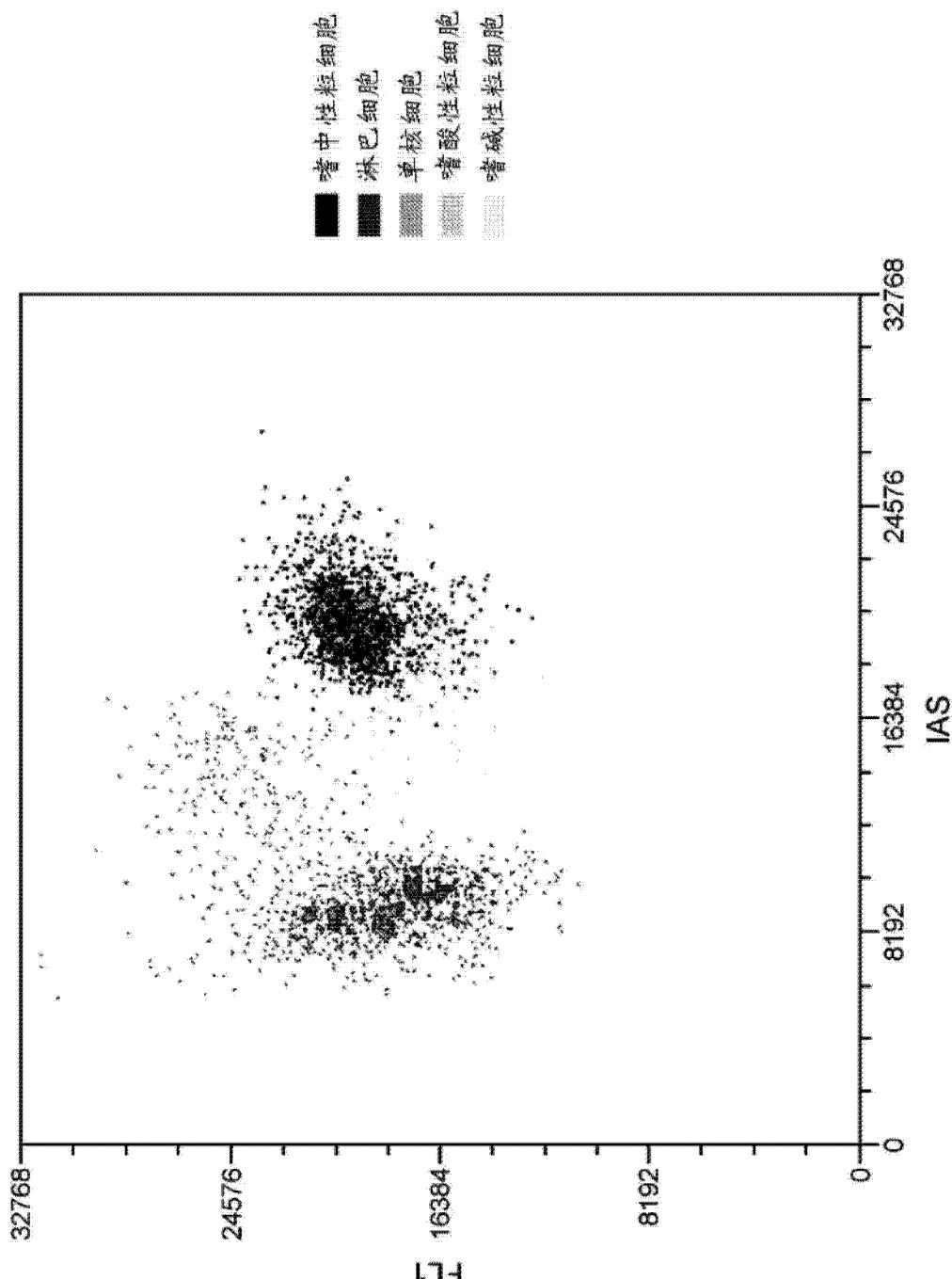


图 1

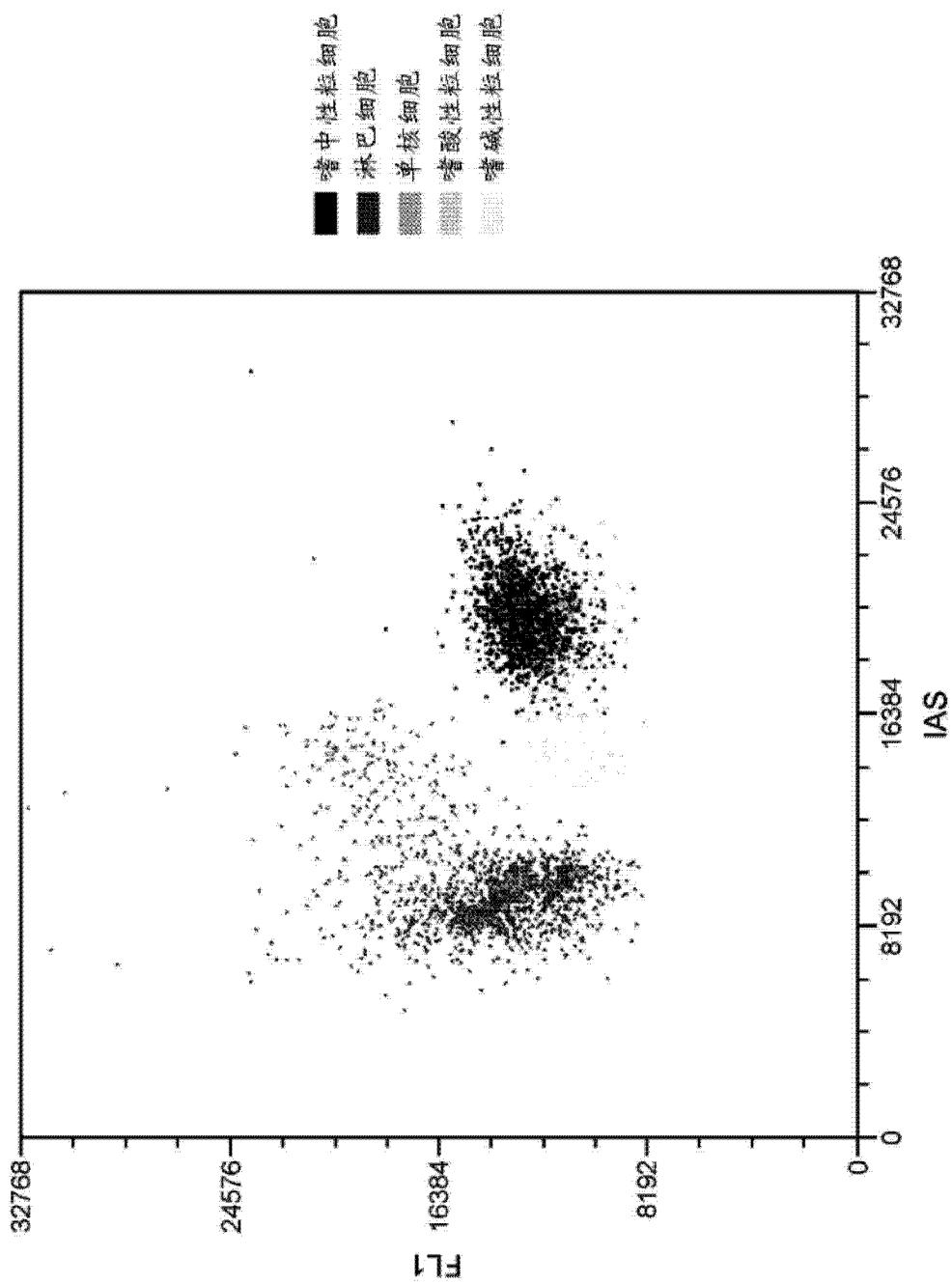


图 2

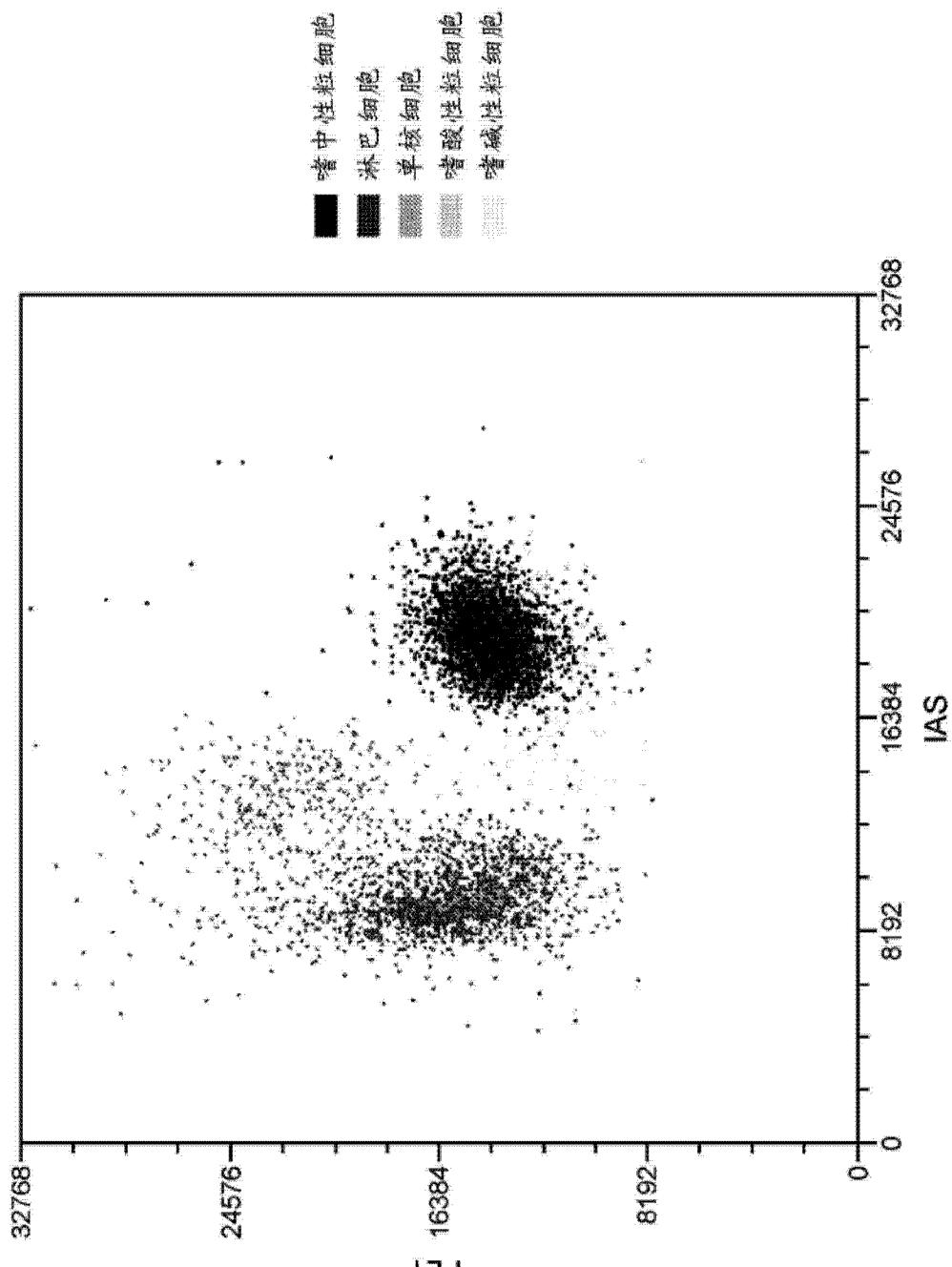


图 3

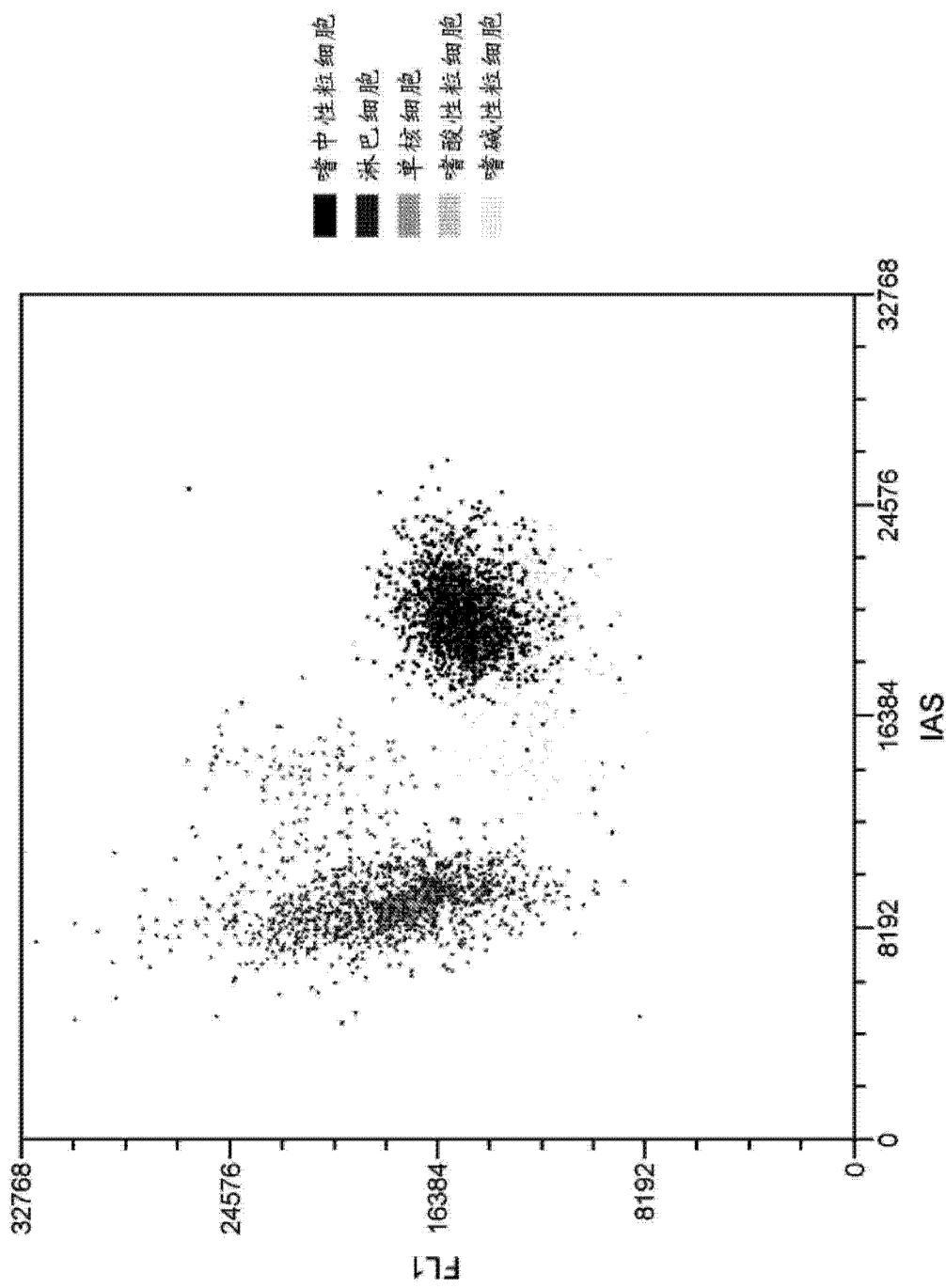


图 4

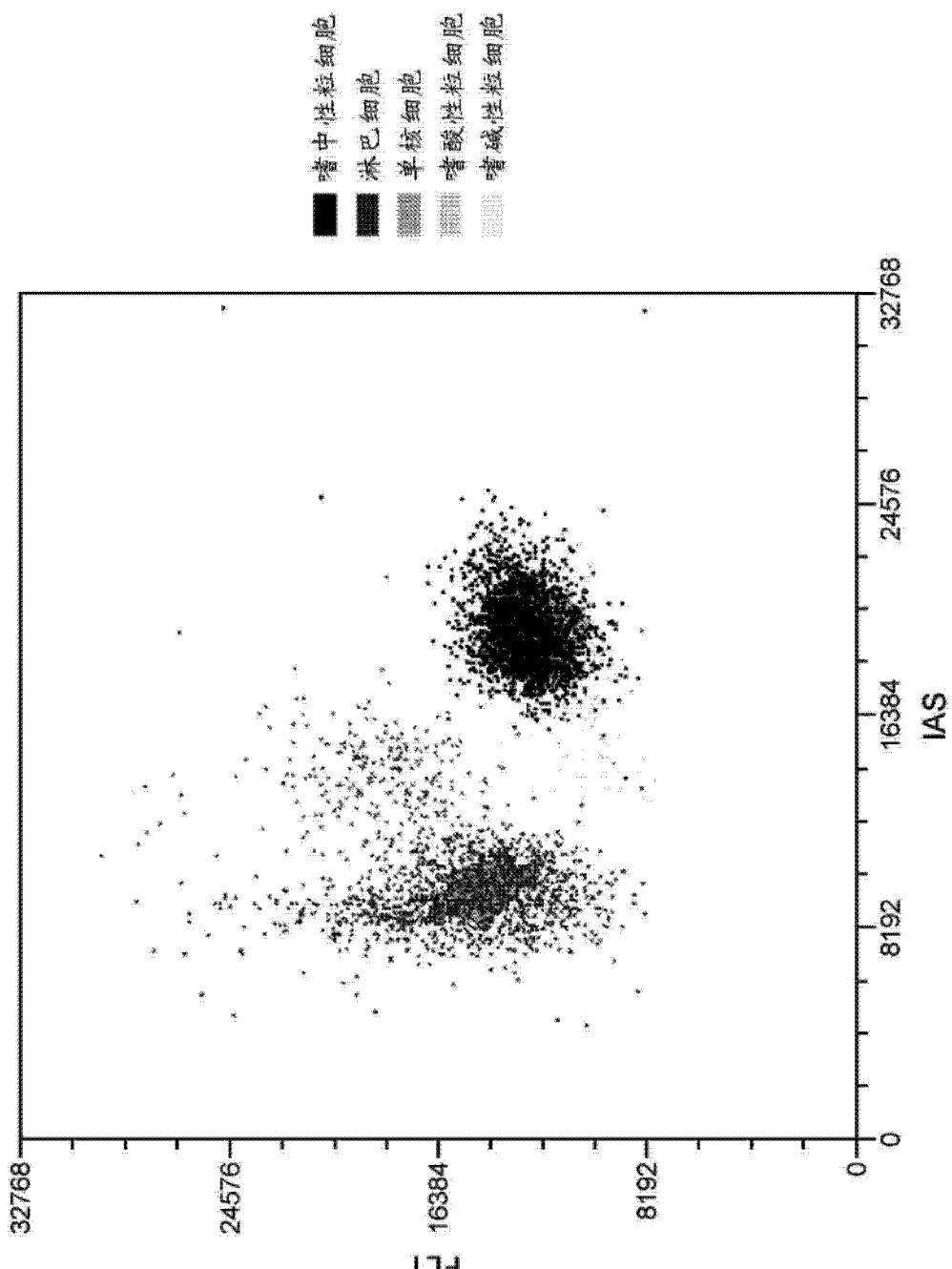


图 5

11.3 μM (1X)

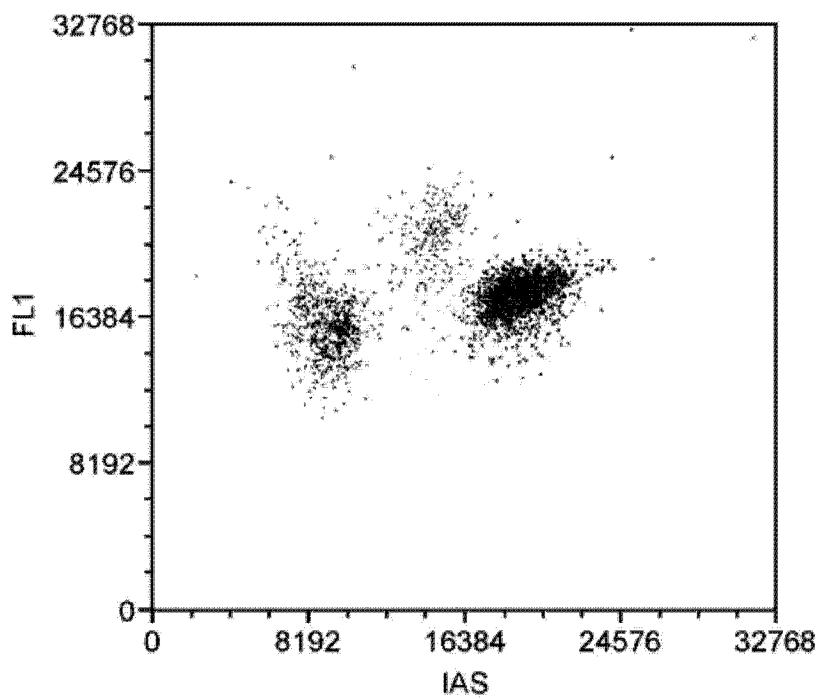
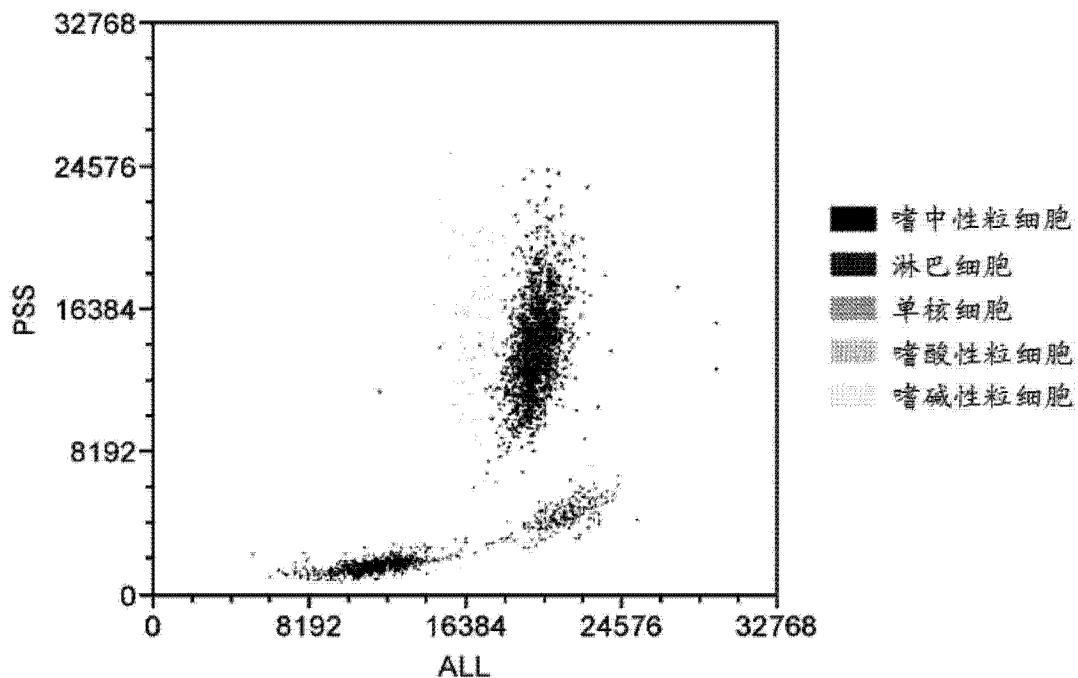


图 6A

1.13 μM (0.1X)

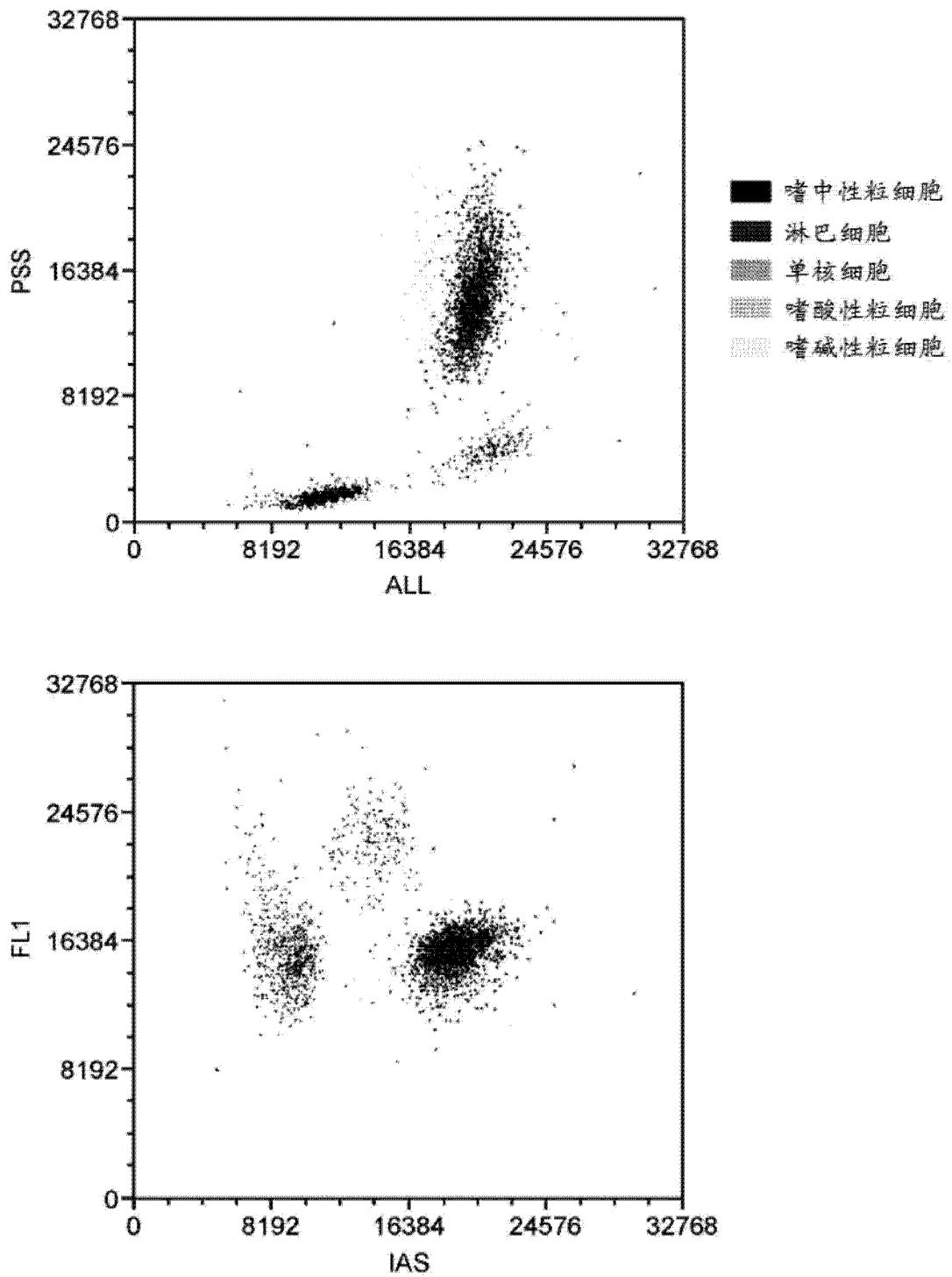


图 6B

0.11 μM (0.01X)

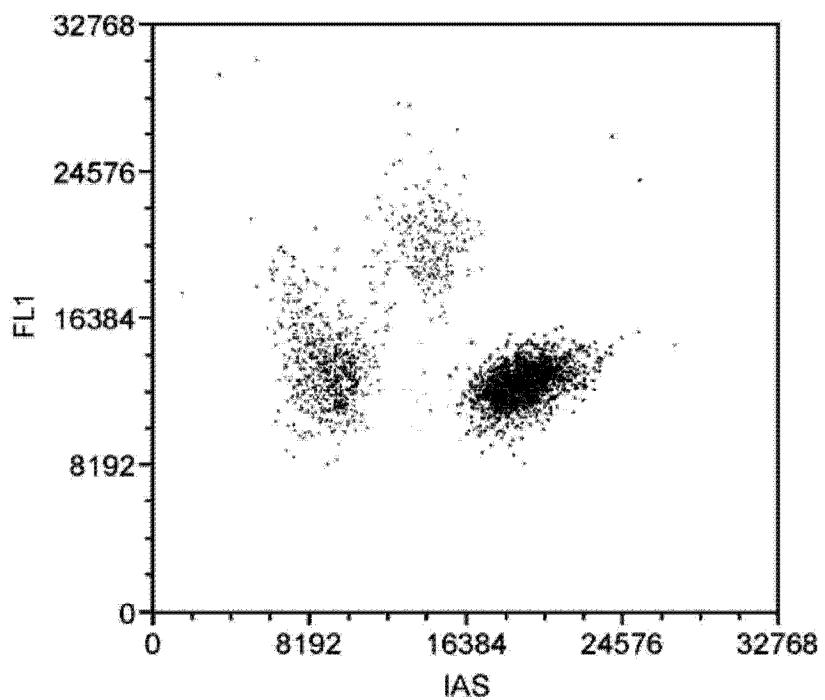
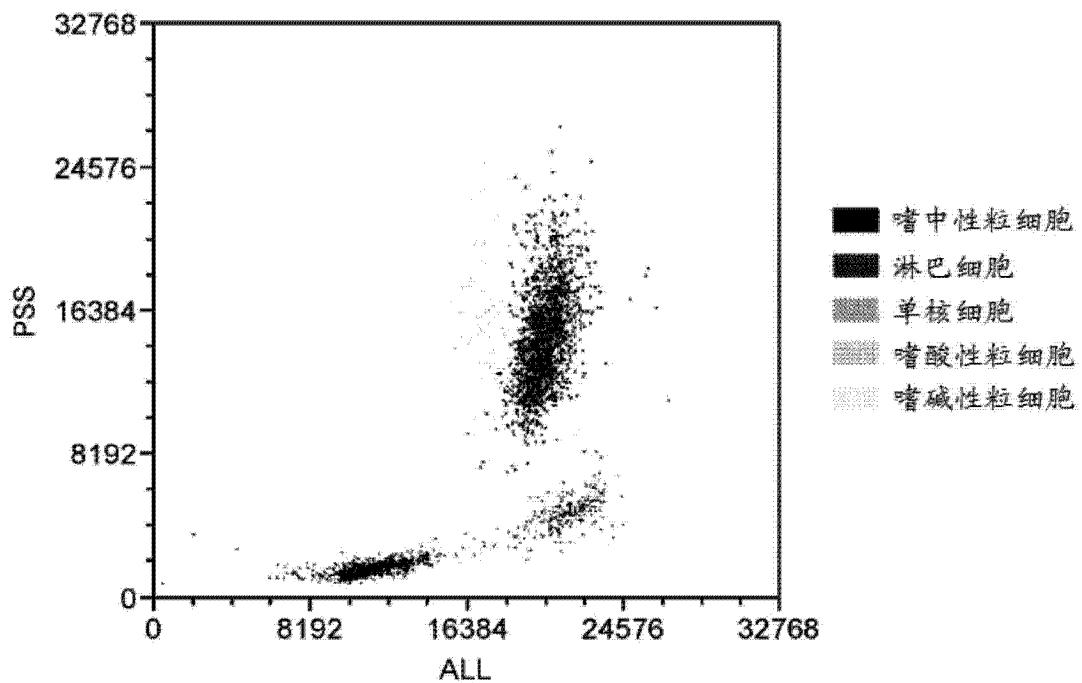


图 6C

0.022 μM (0.002X)

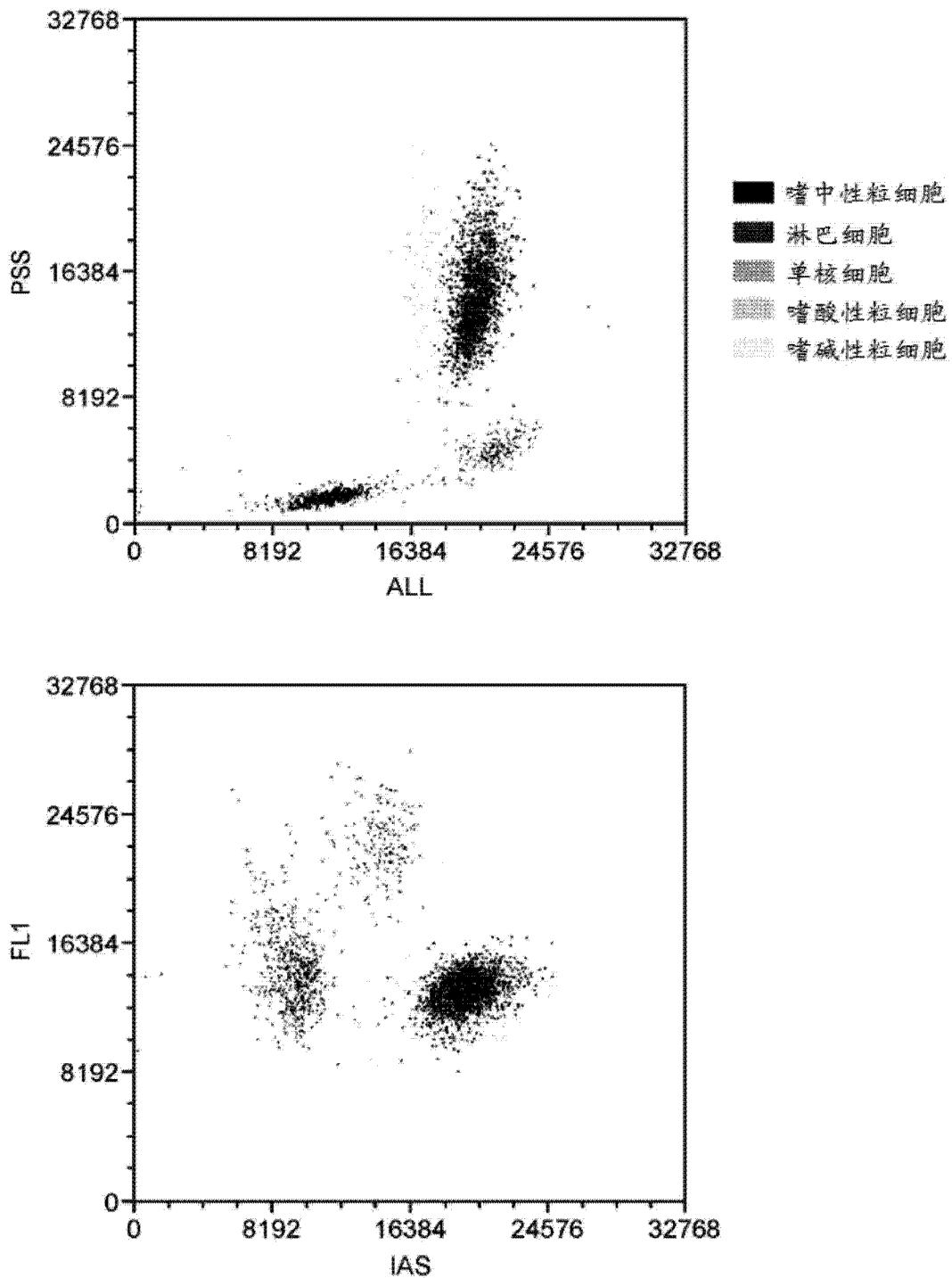


图 6D

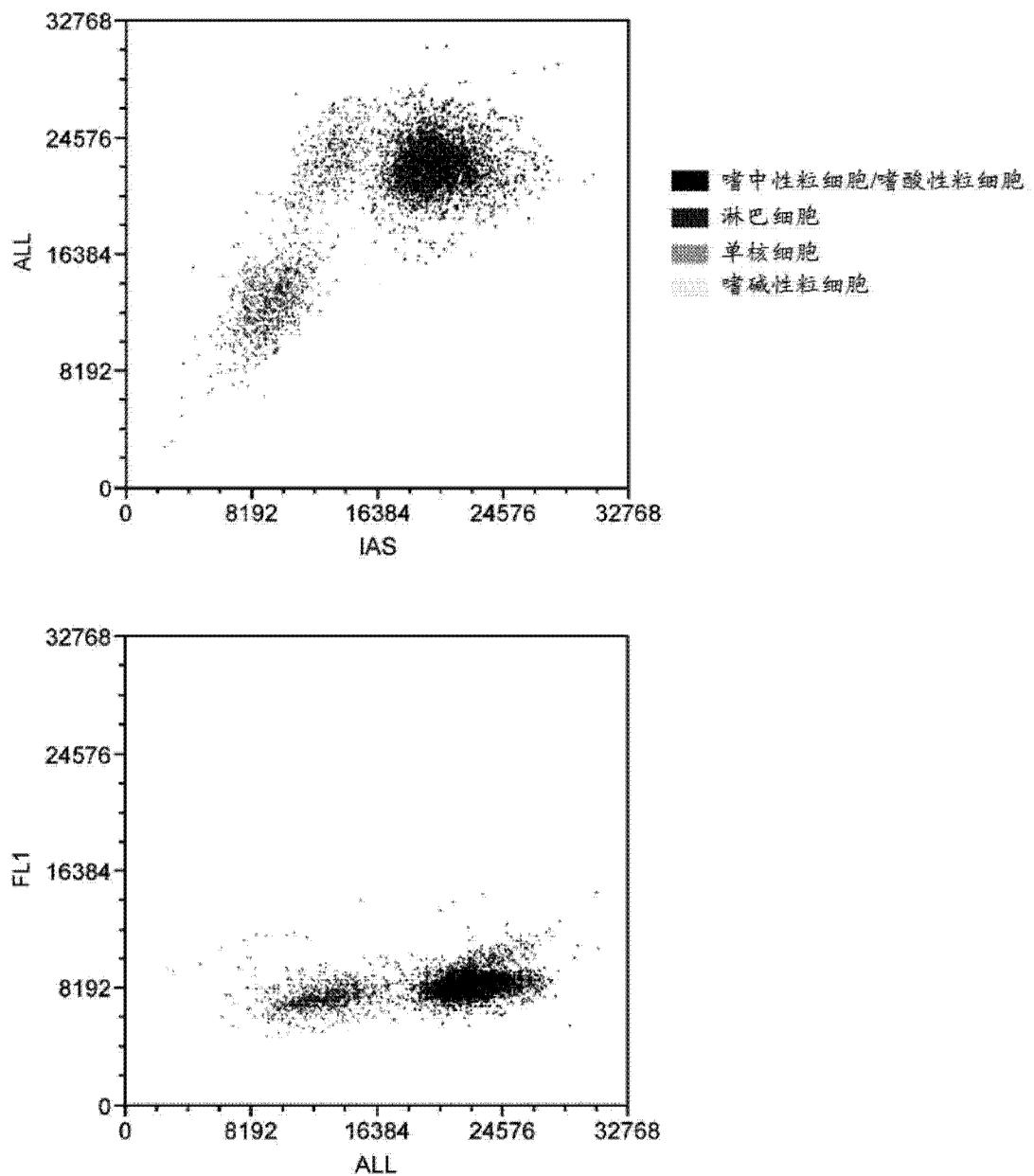


图 7A

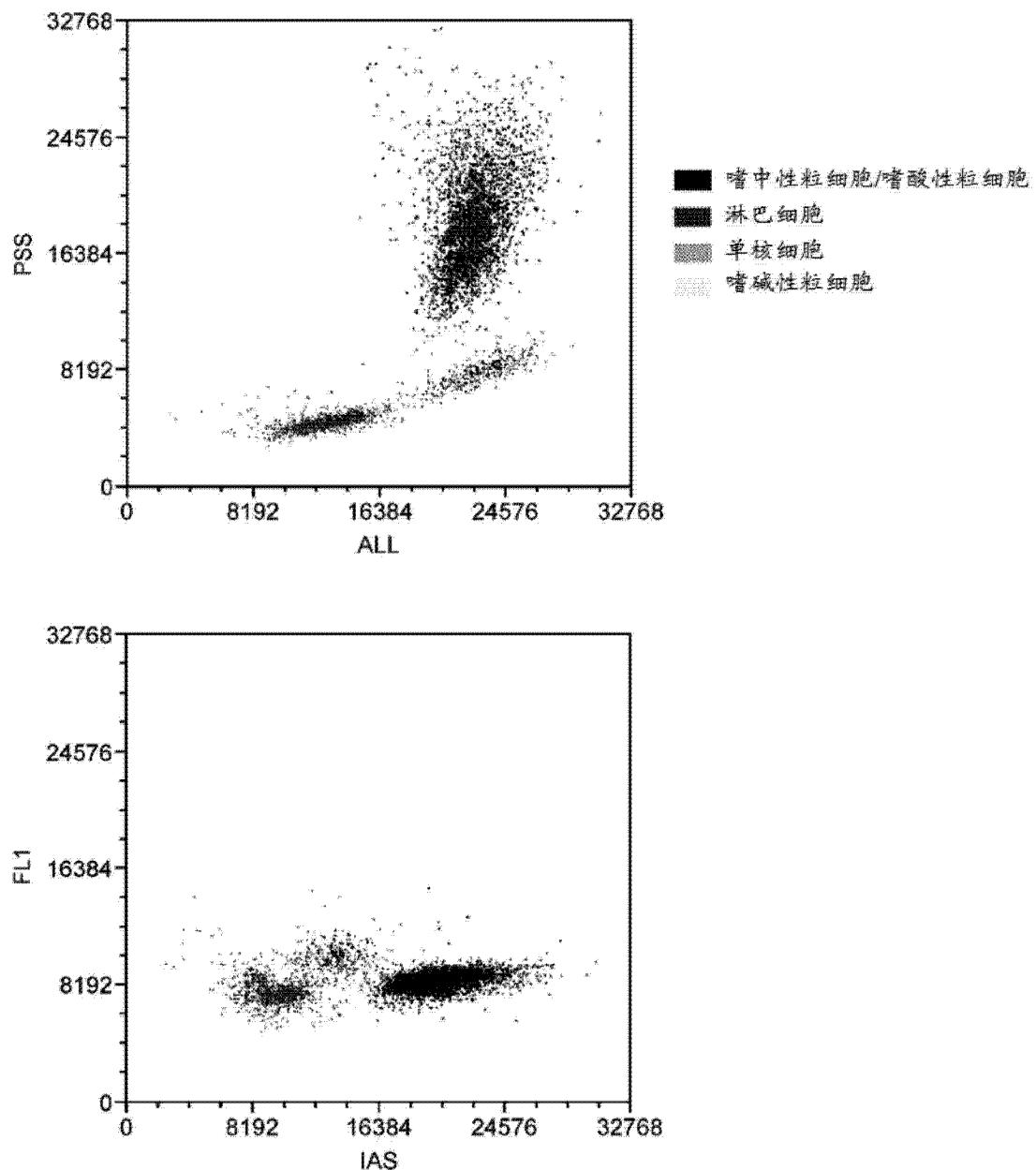


图 7B

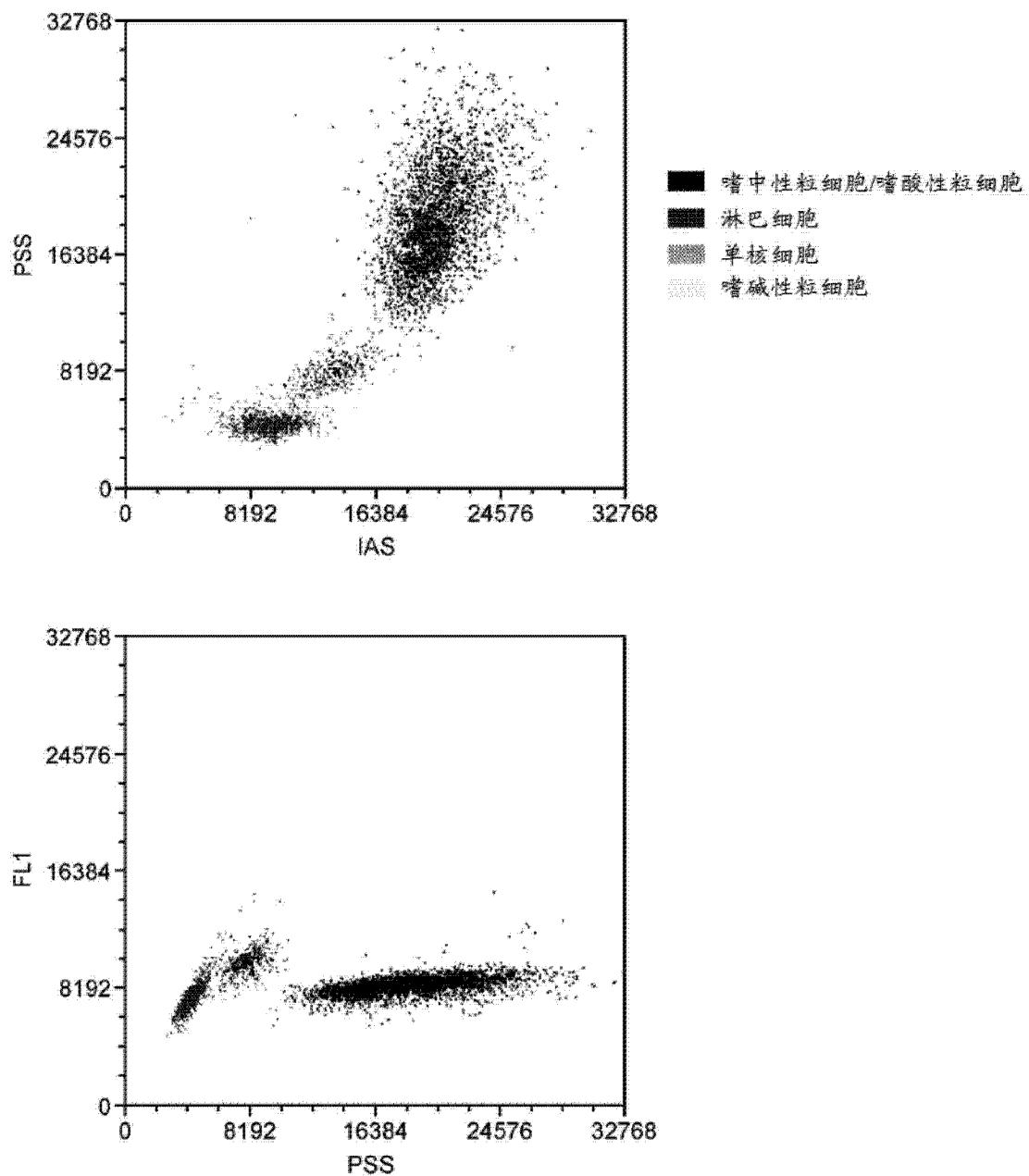


图 7C

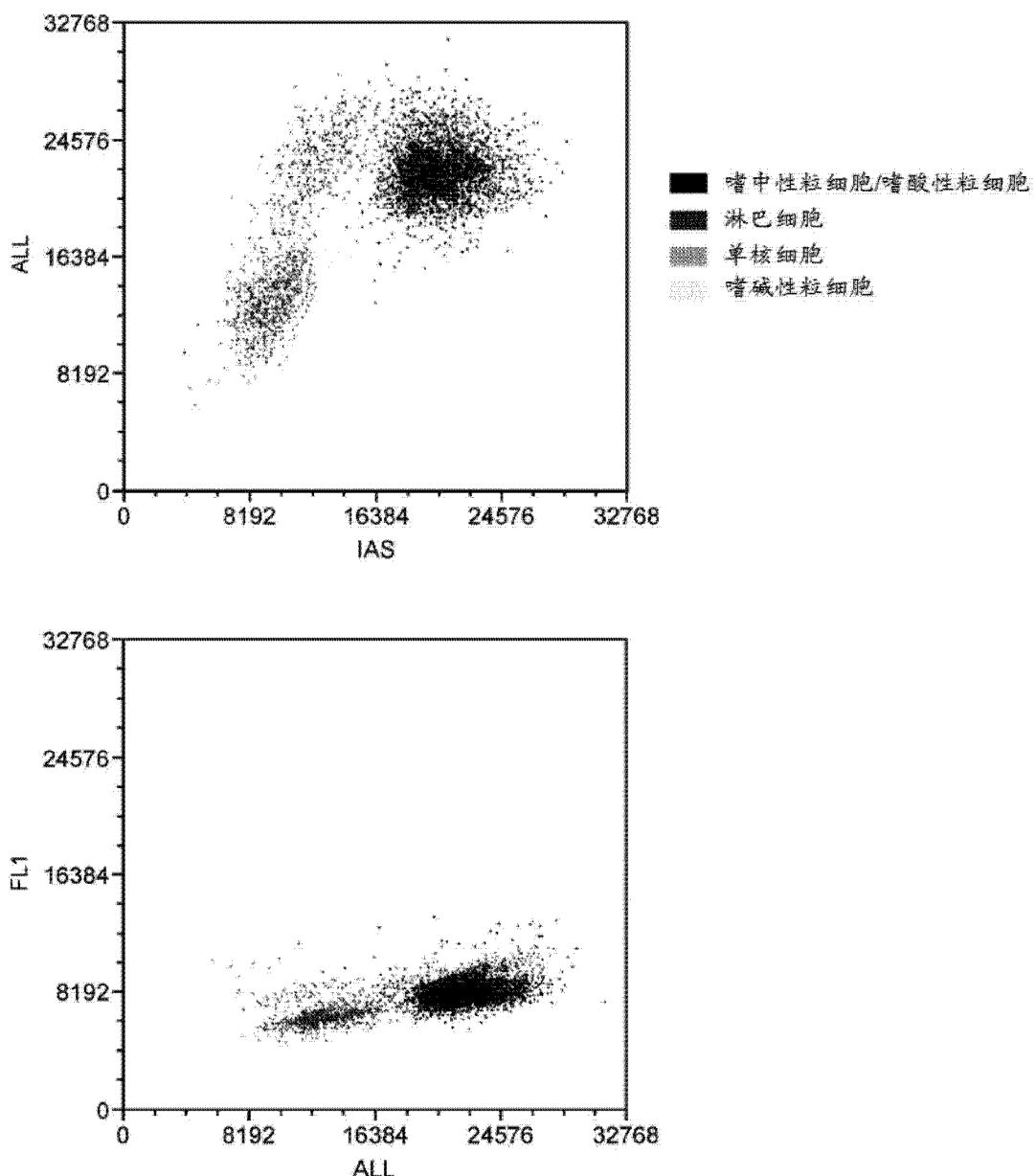


图 8A

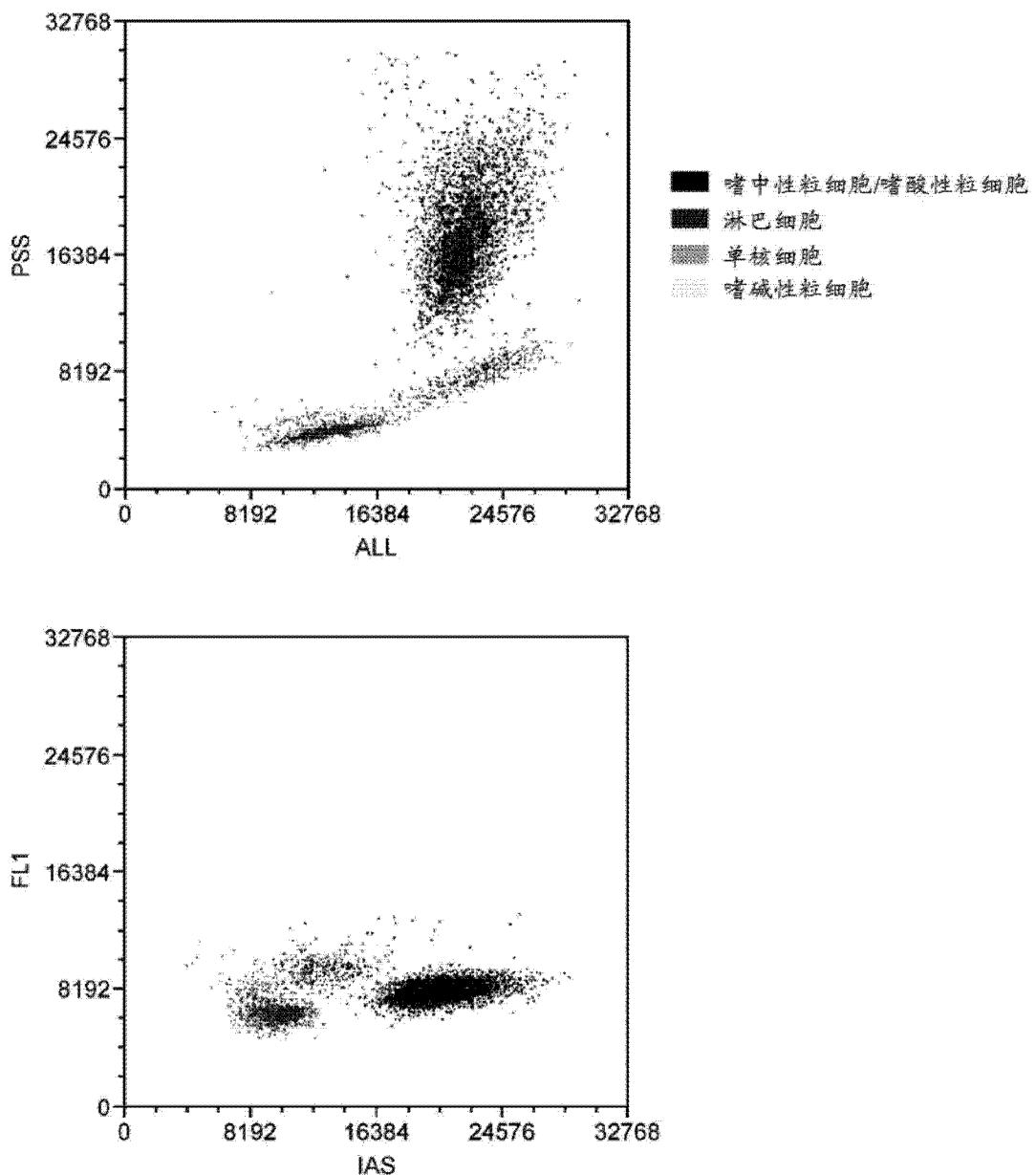


图 8B

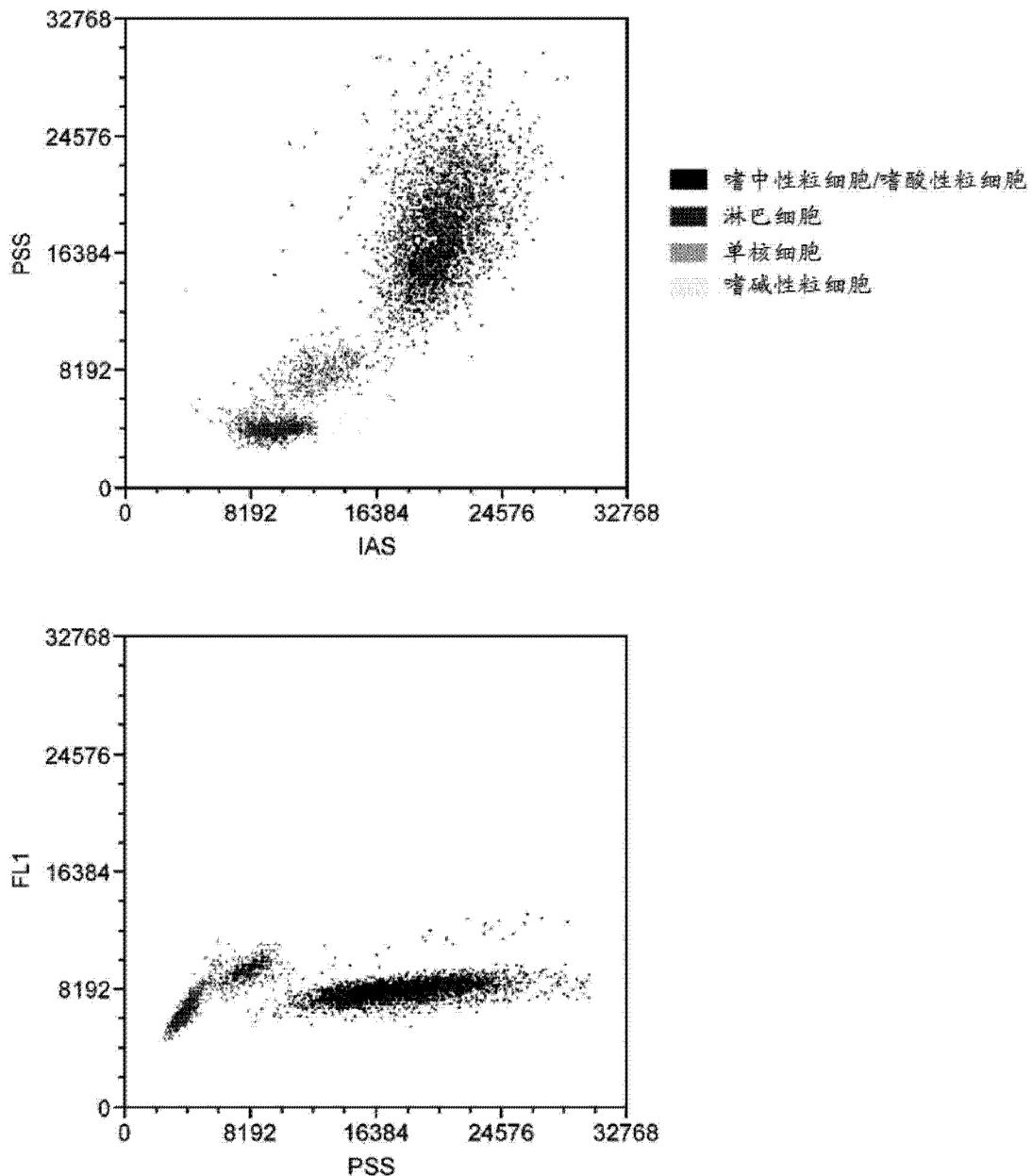


图 8C

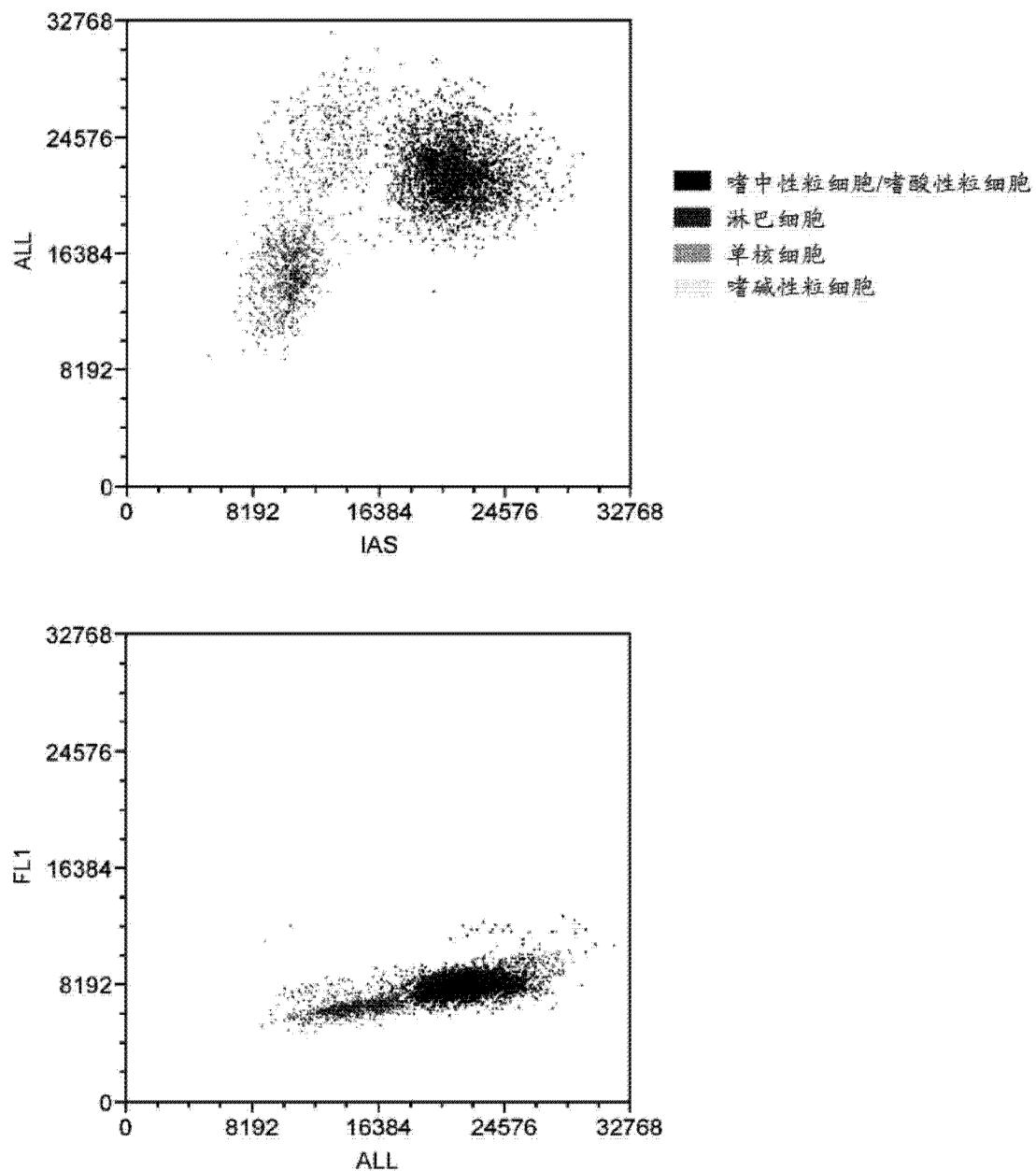


图 9A

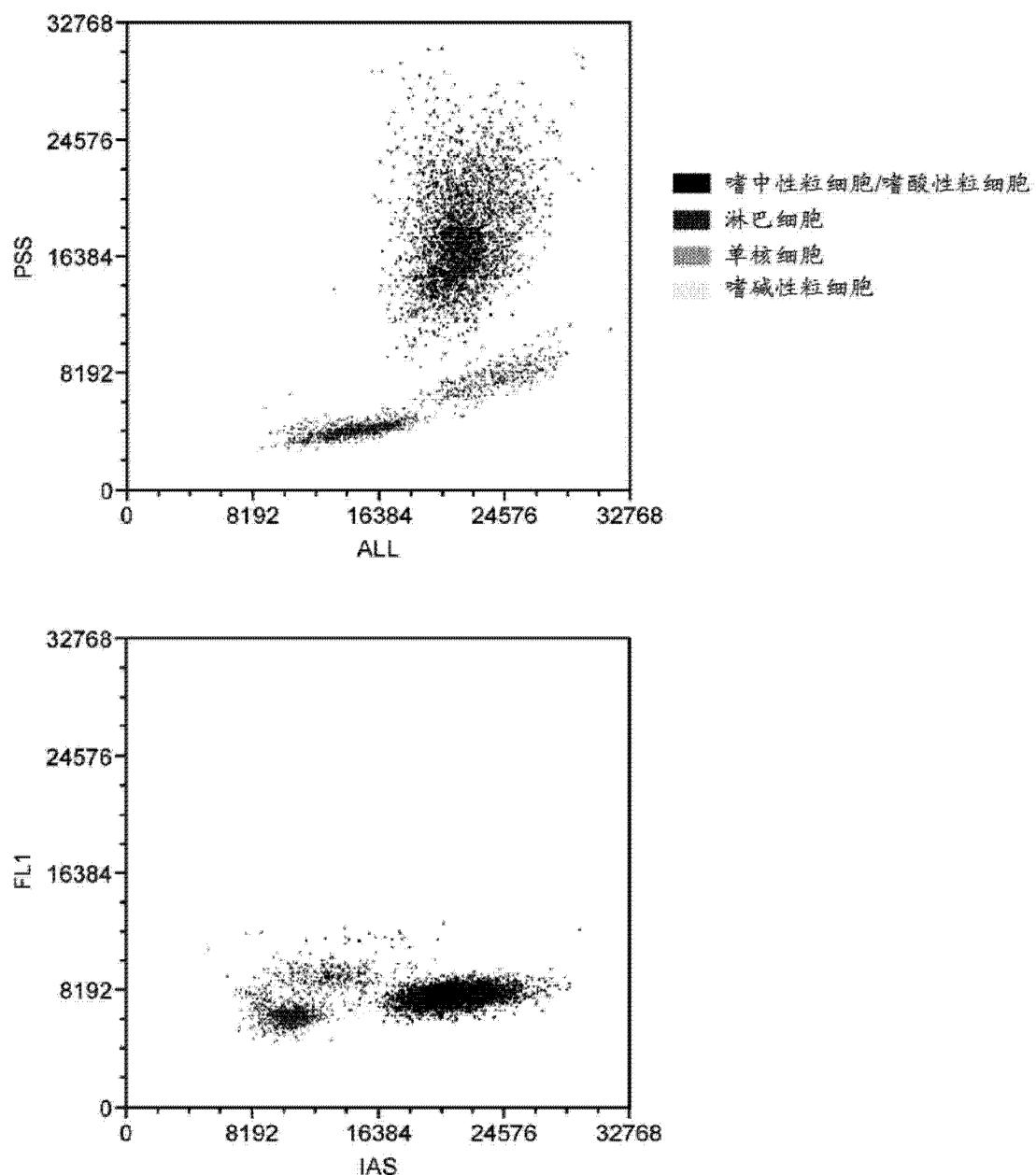


图 9B

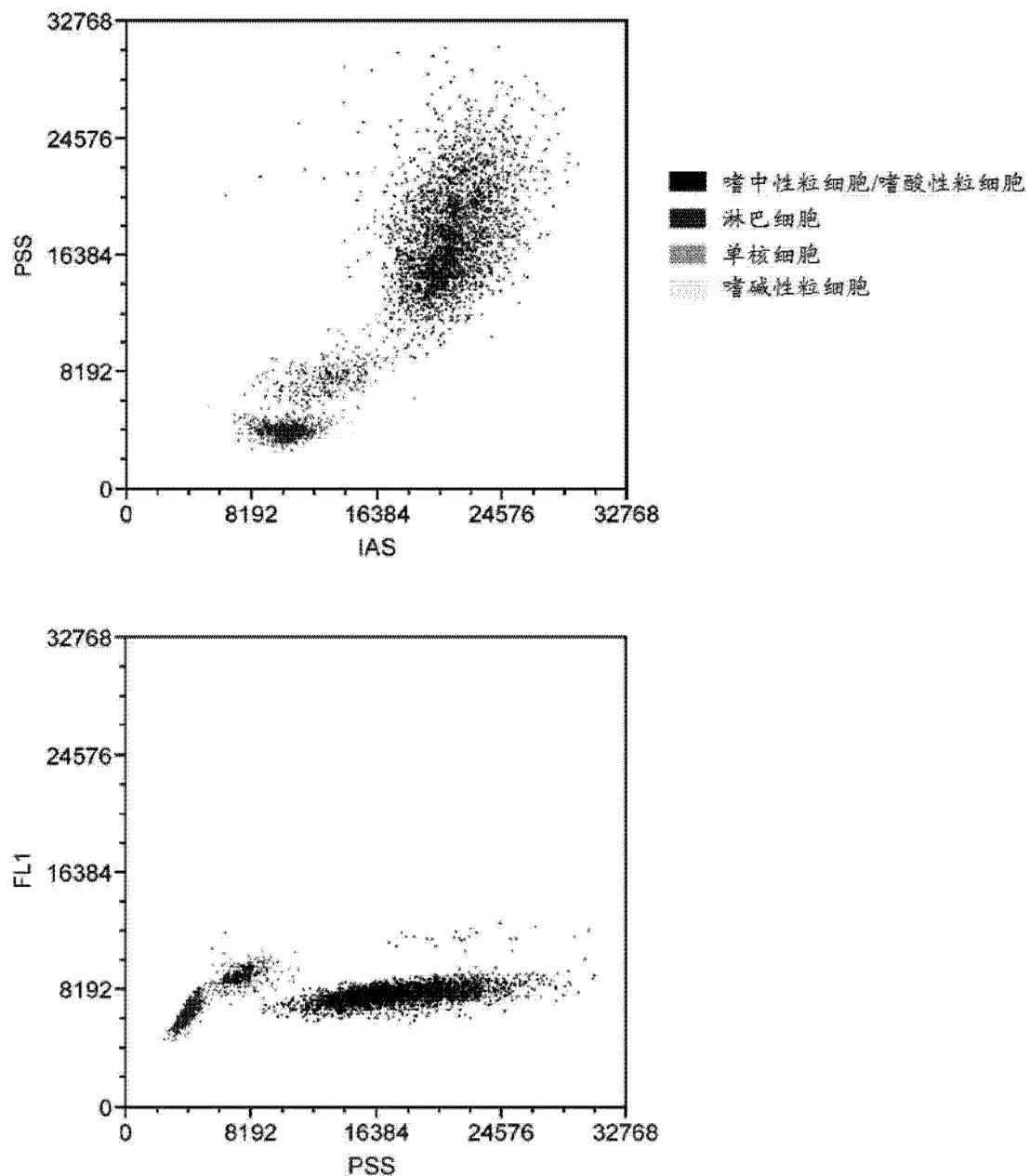


图 9C

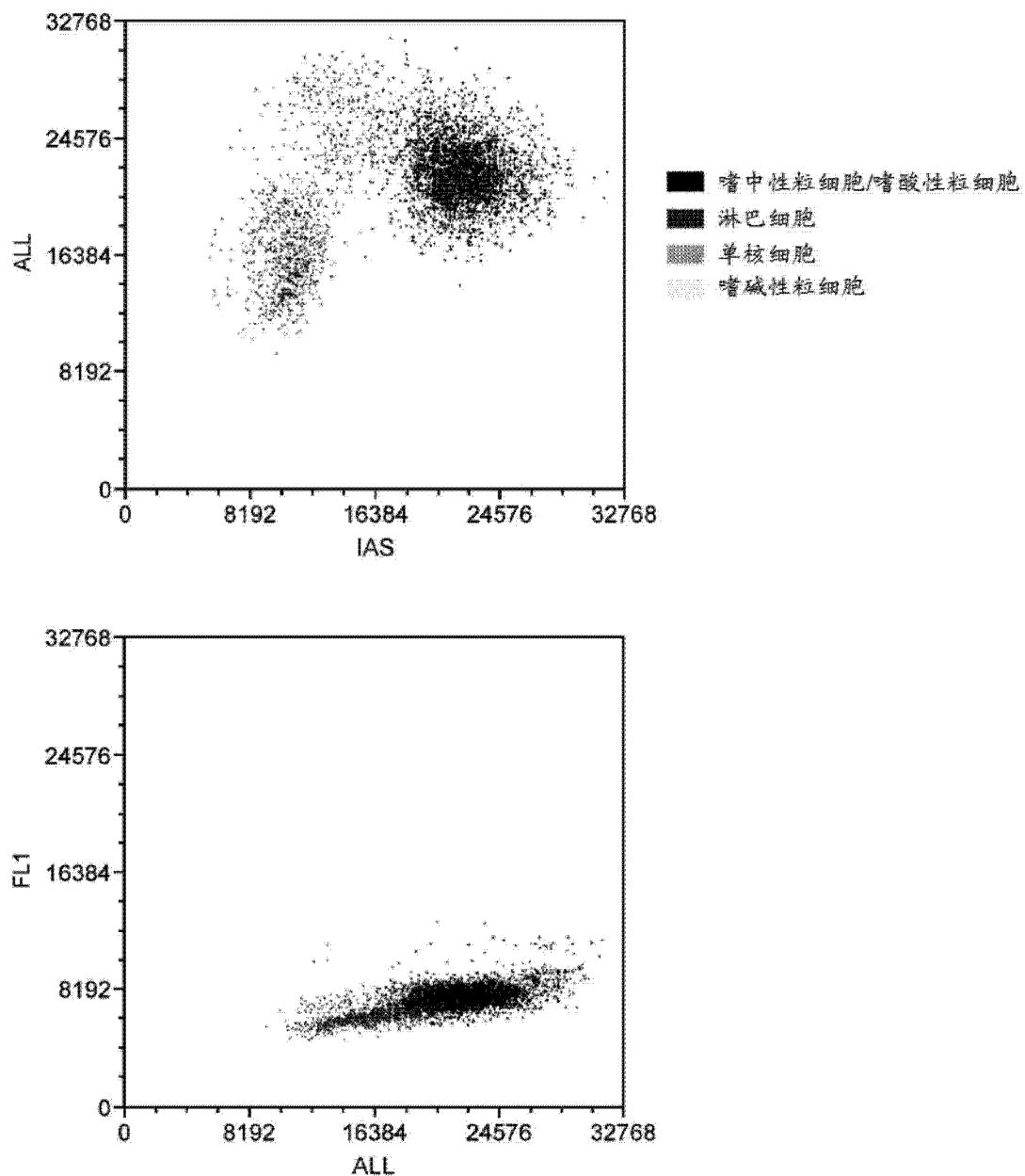


图 10A

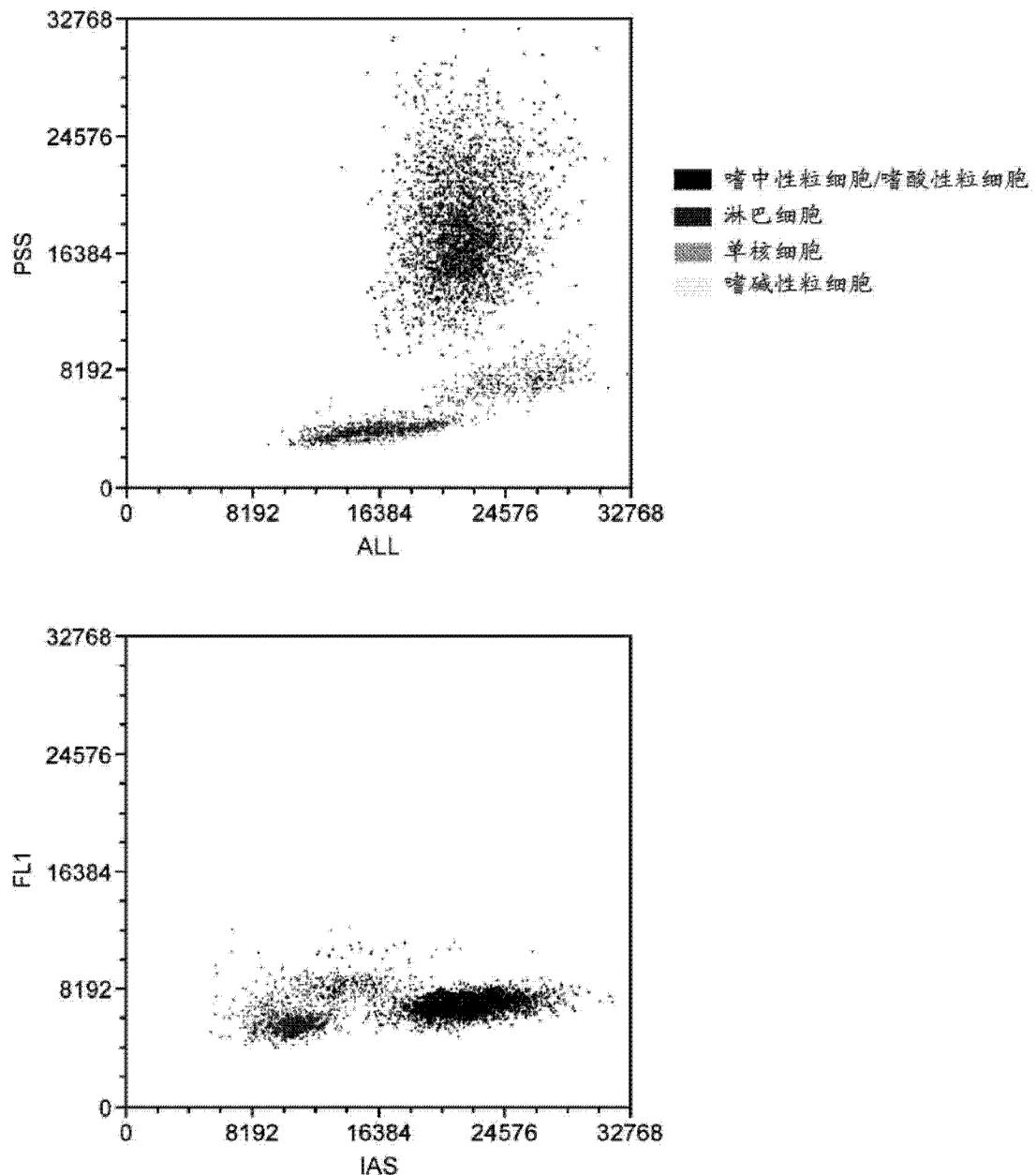


图 10B

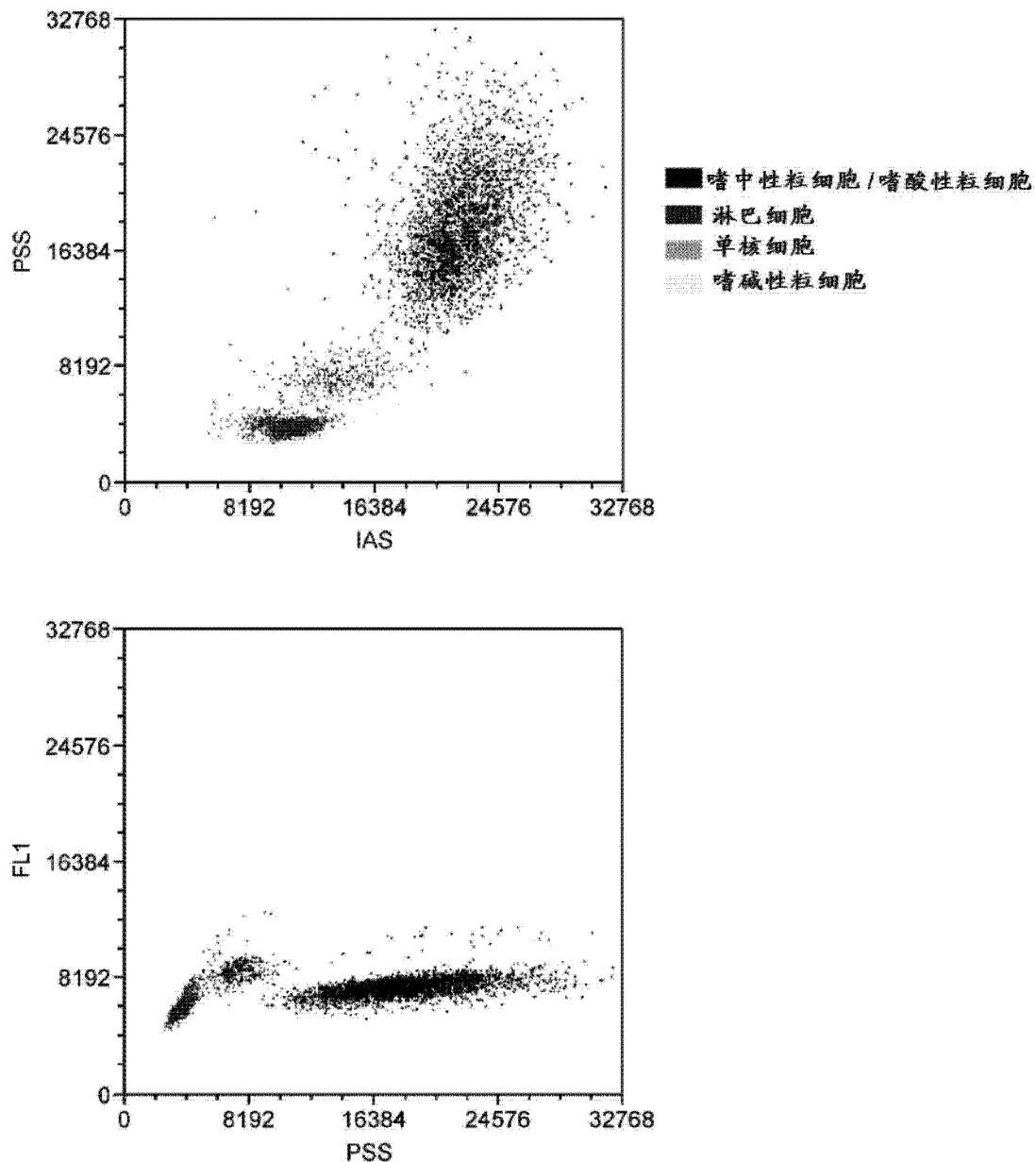


图 10C

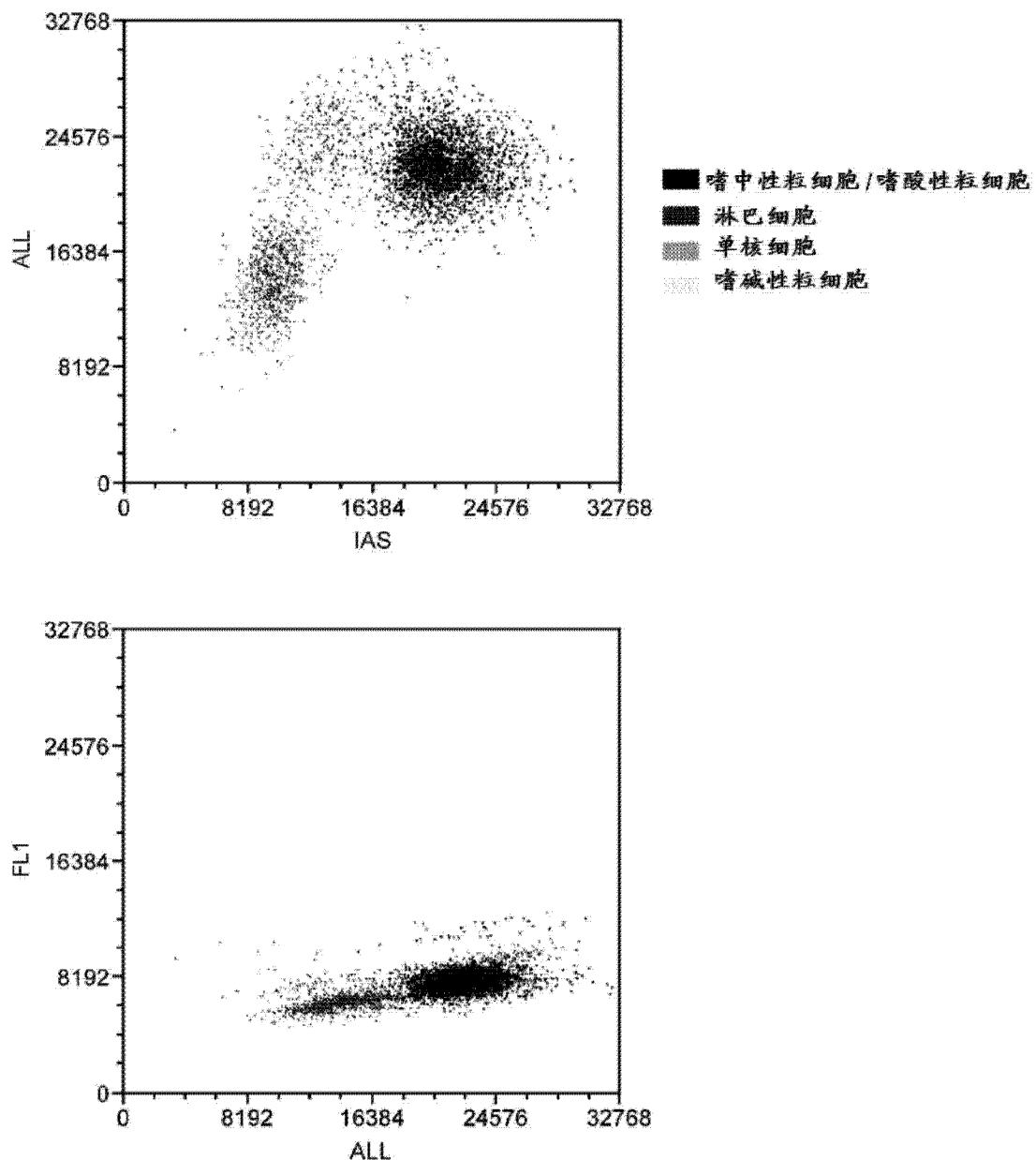


图 11A

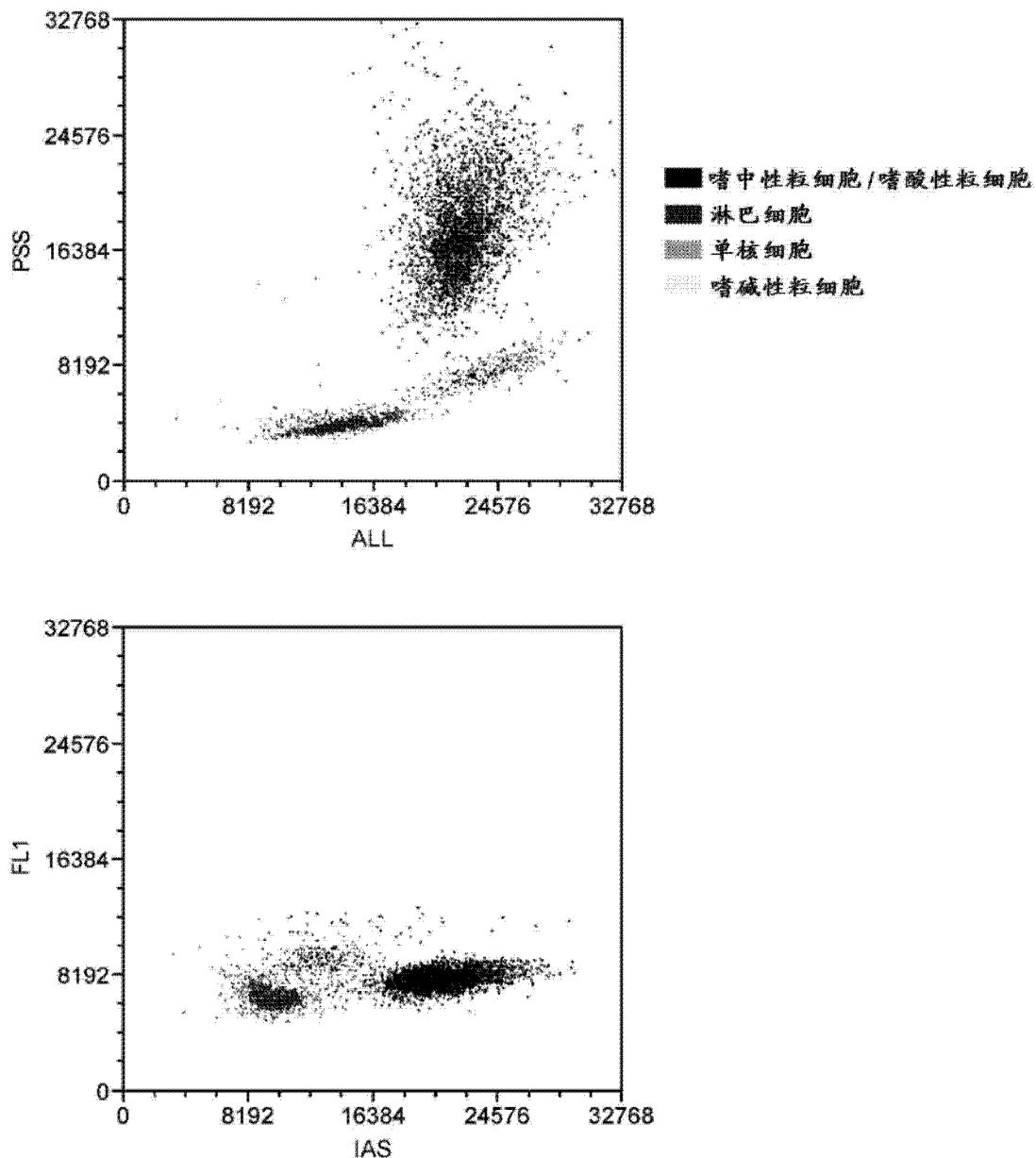


图 11B

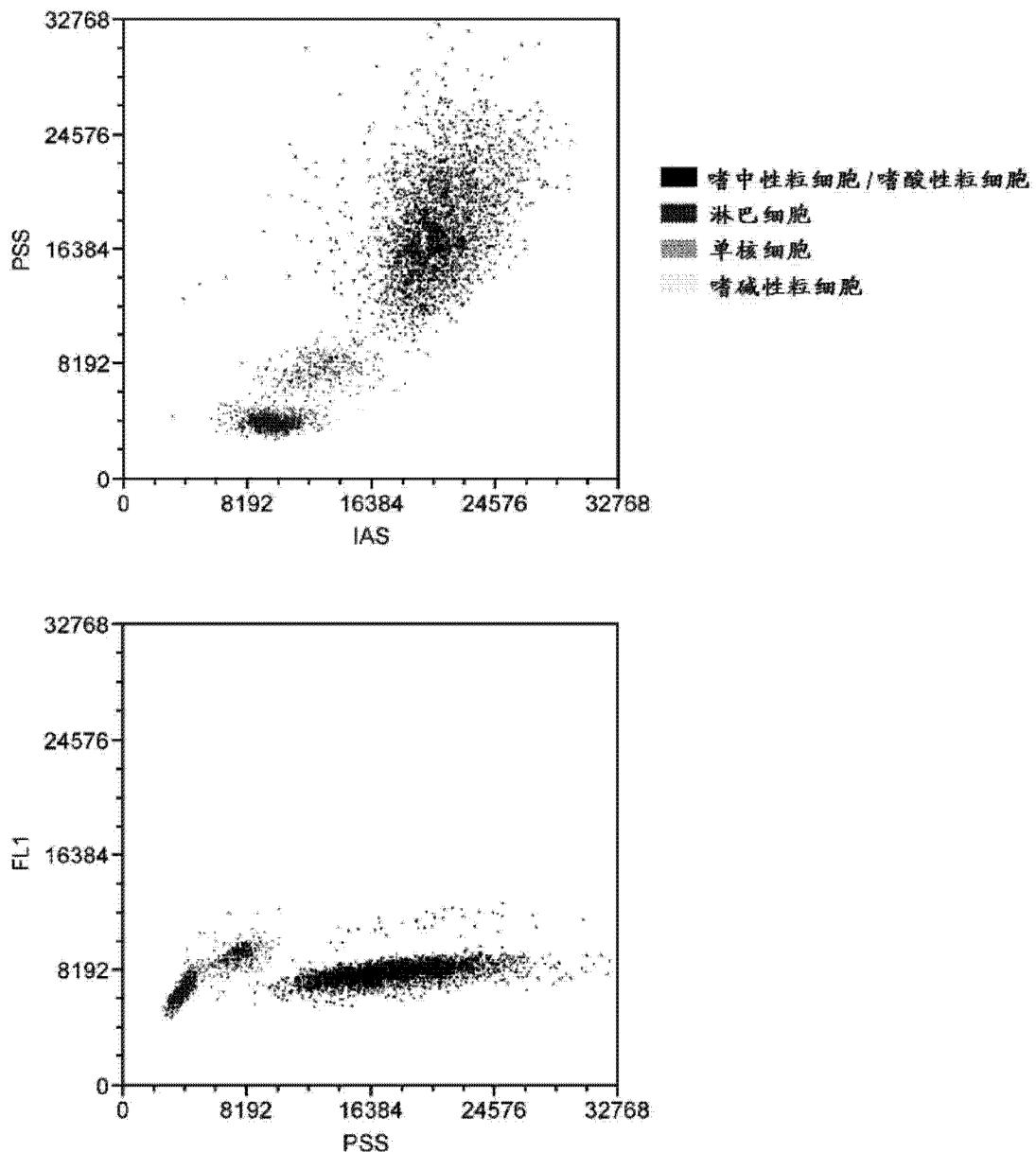


图 11C

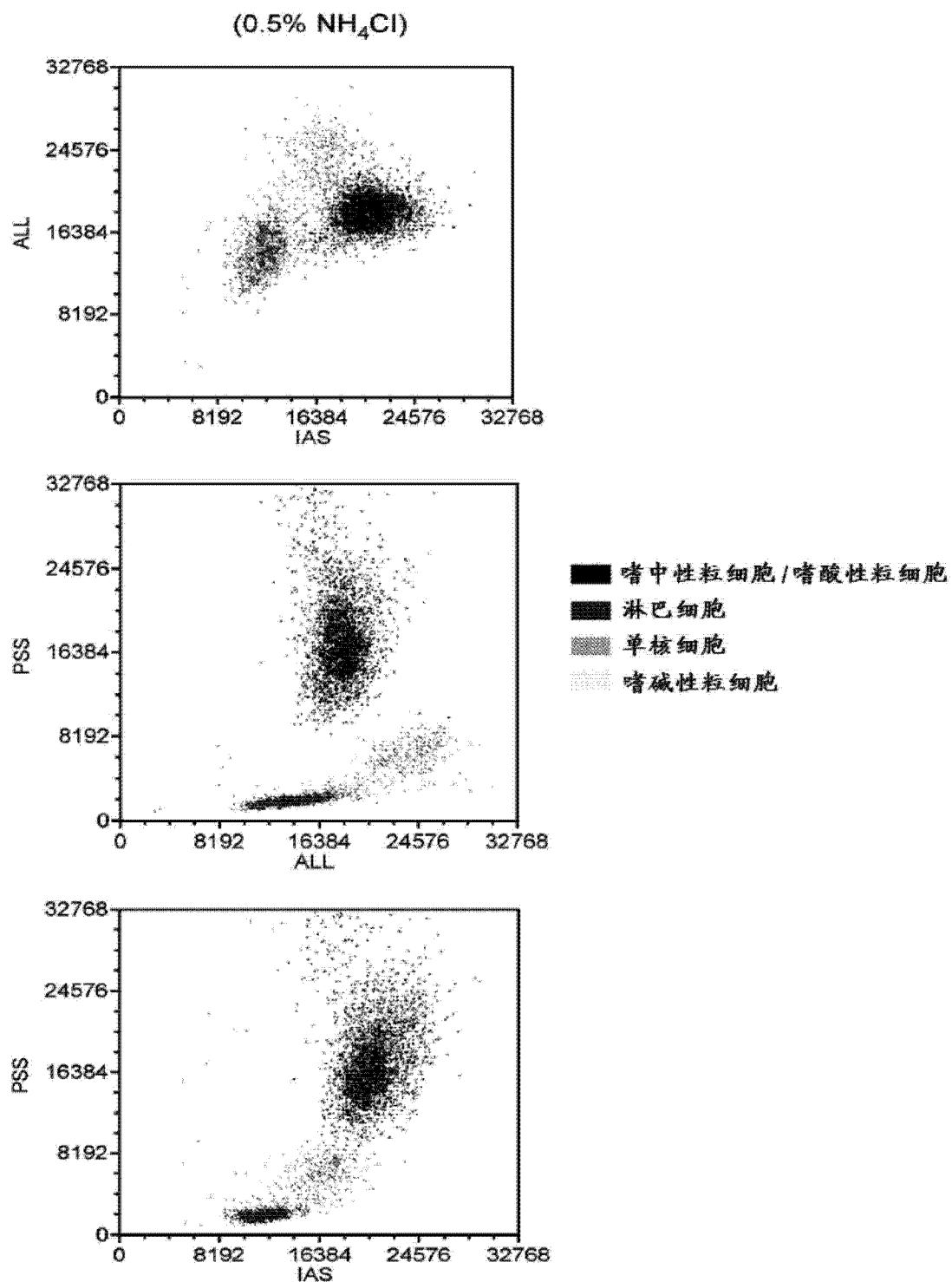


图 12A

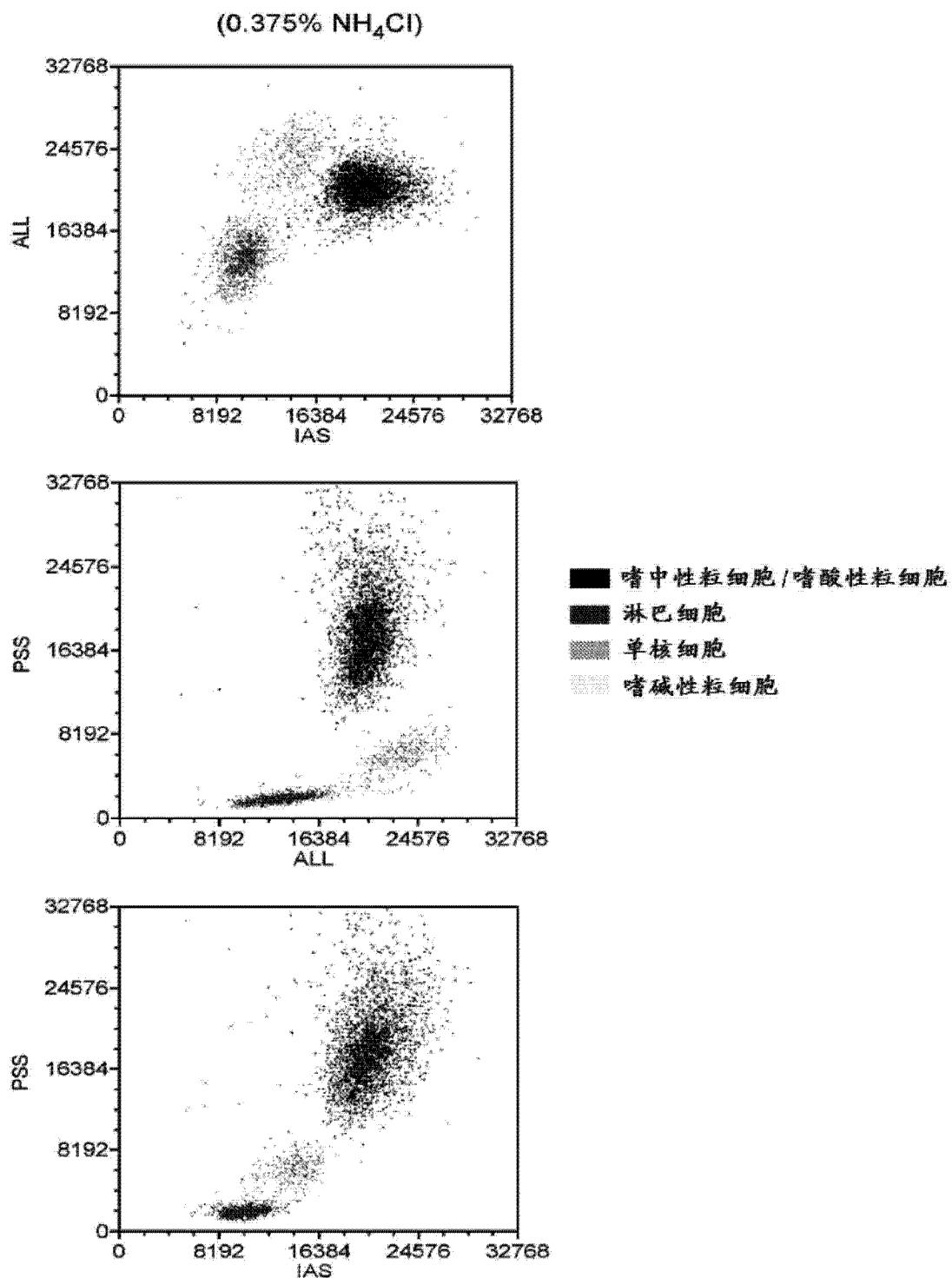


图 12B

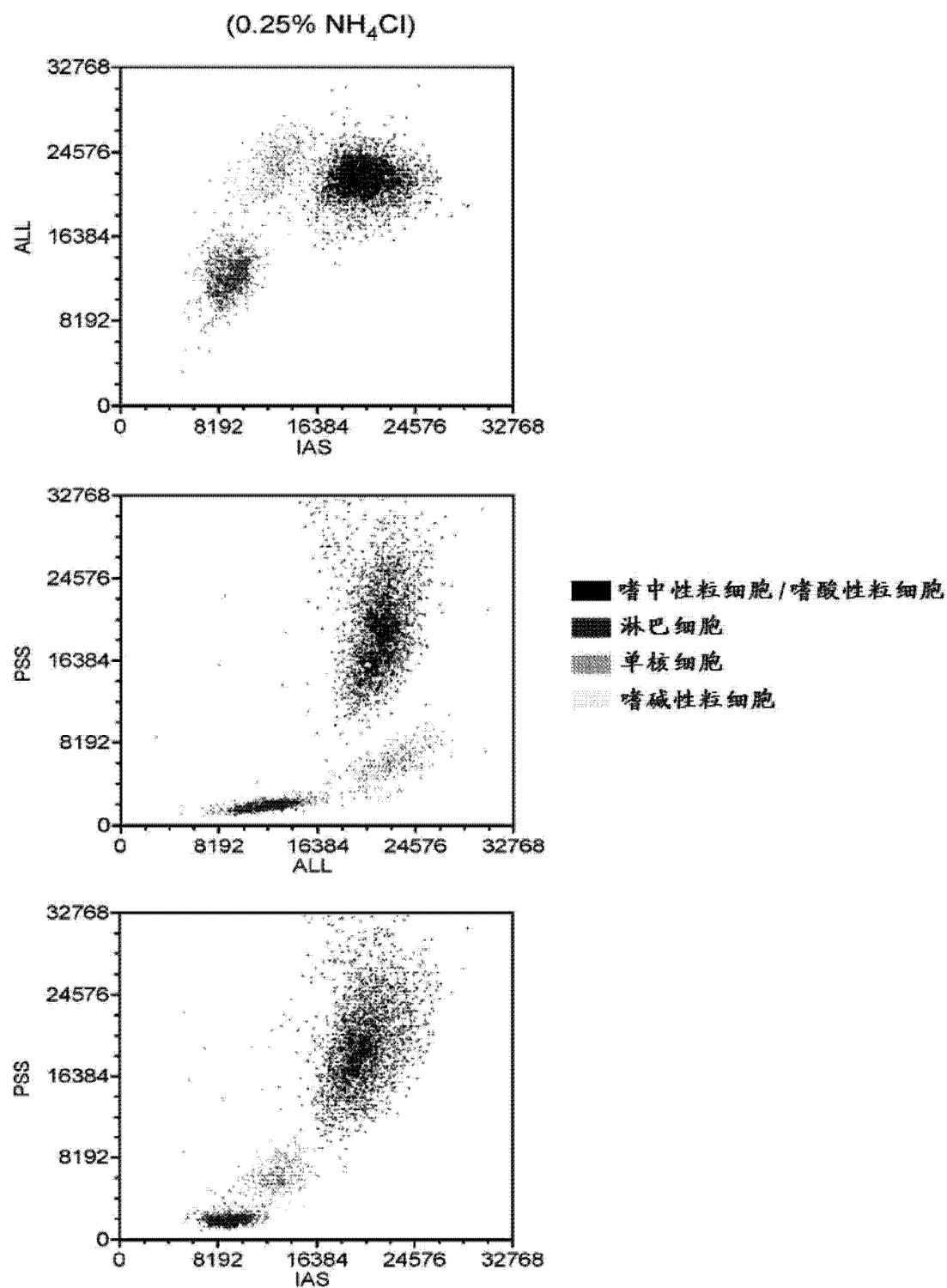


图 12C

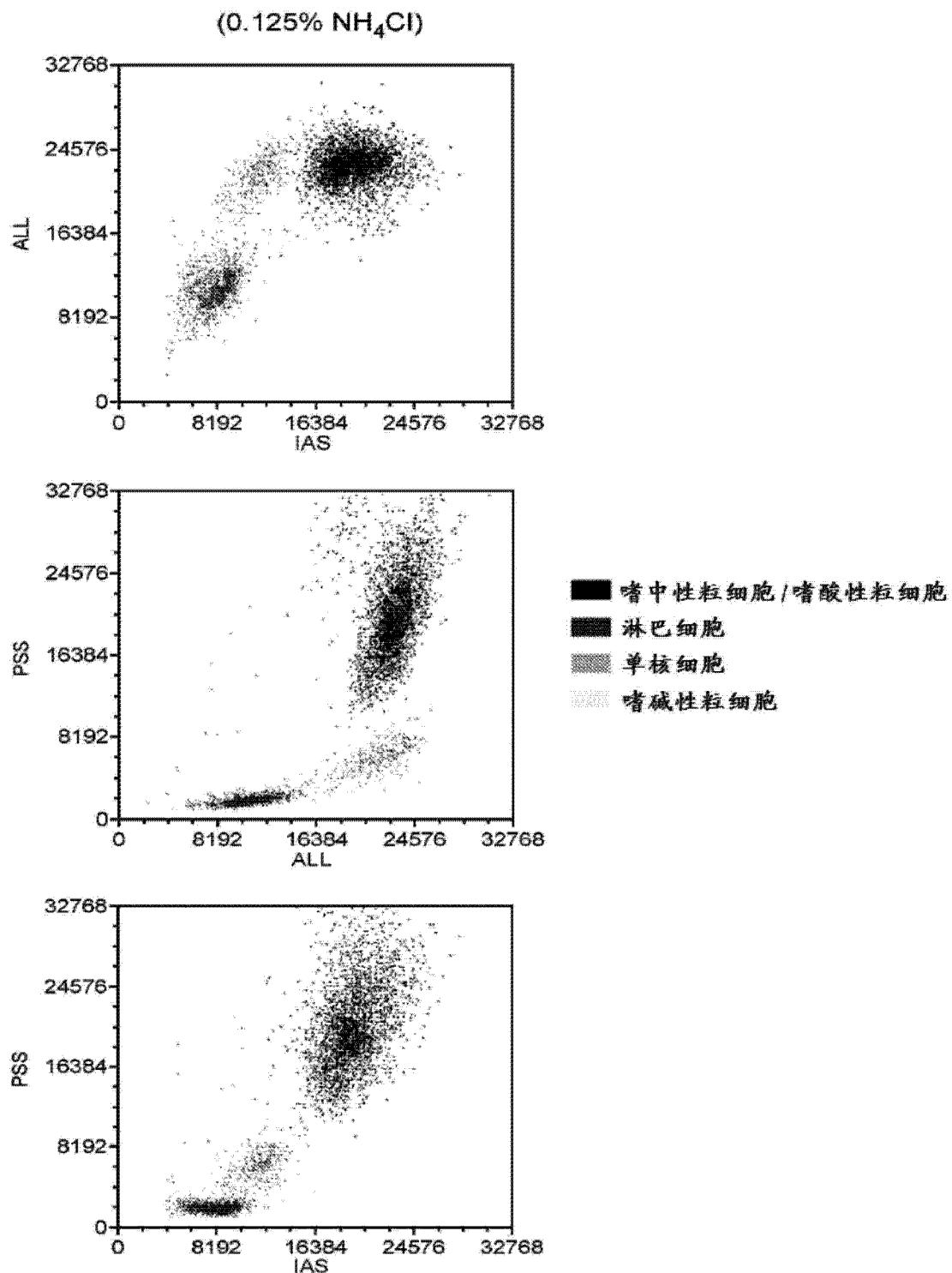


图 12D

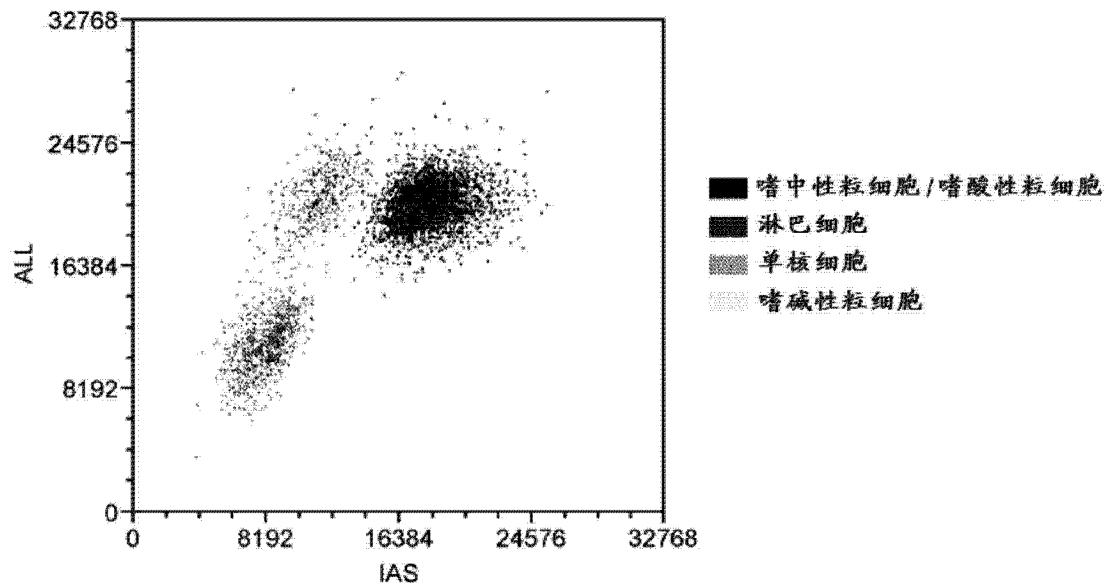
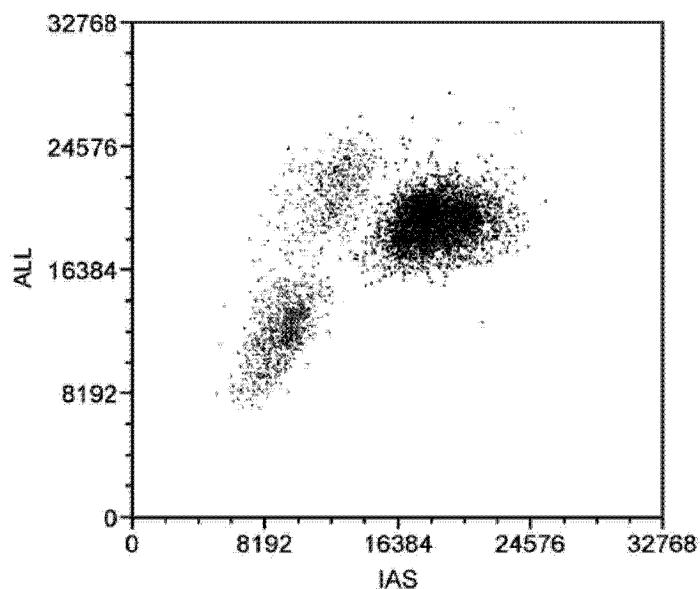
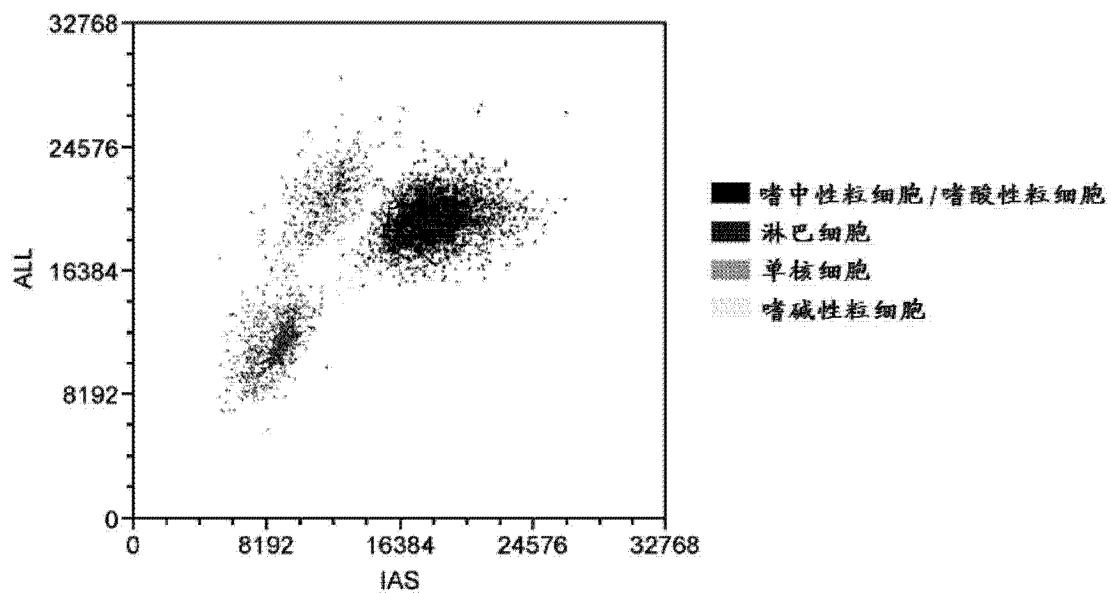
A**B**

图 13

C



D

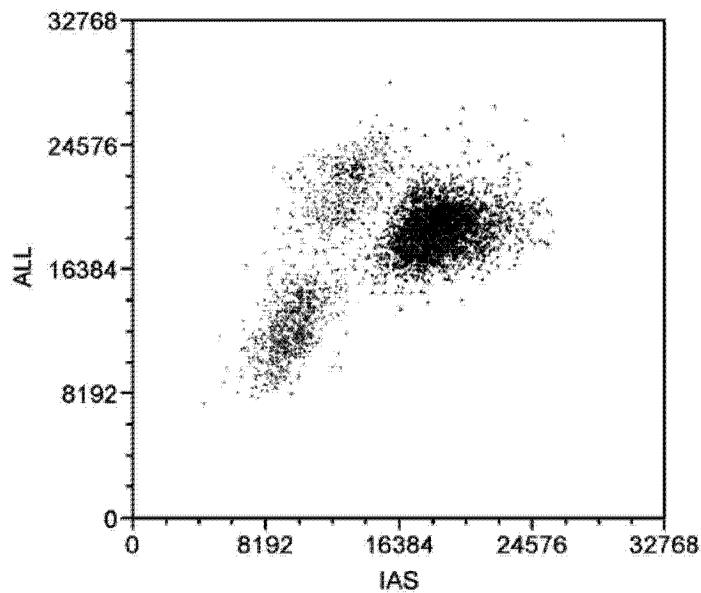


图 13(续)

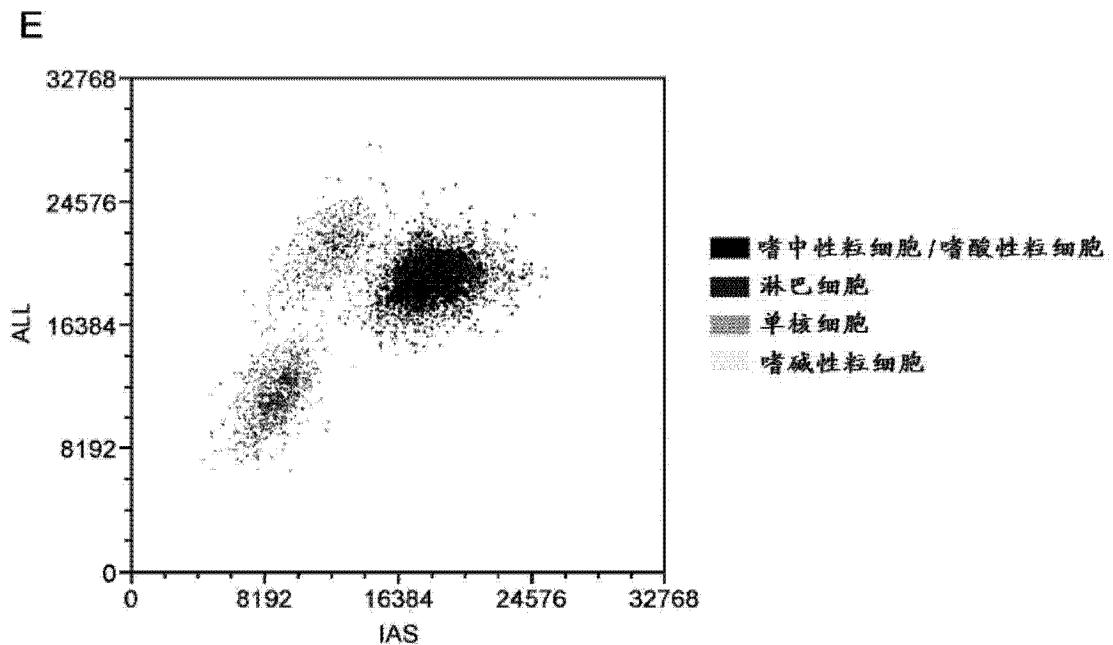


图 13(续)

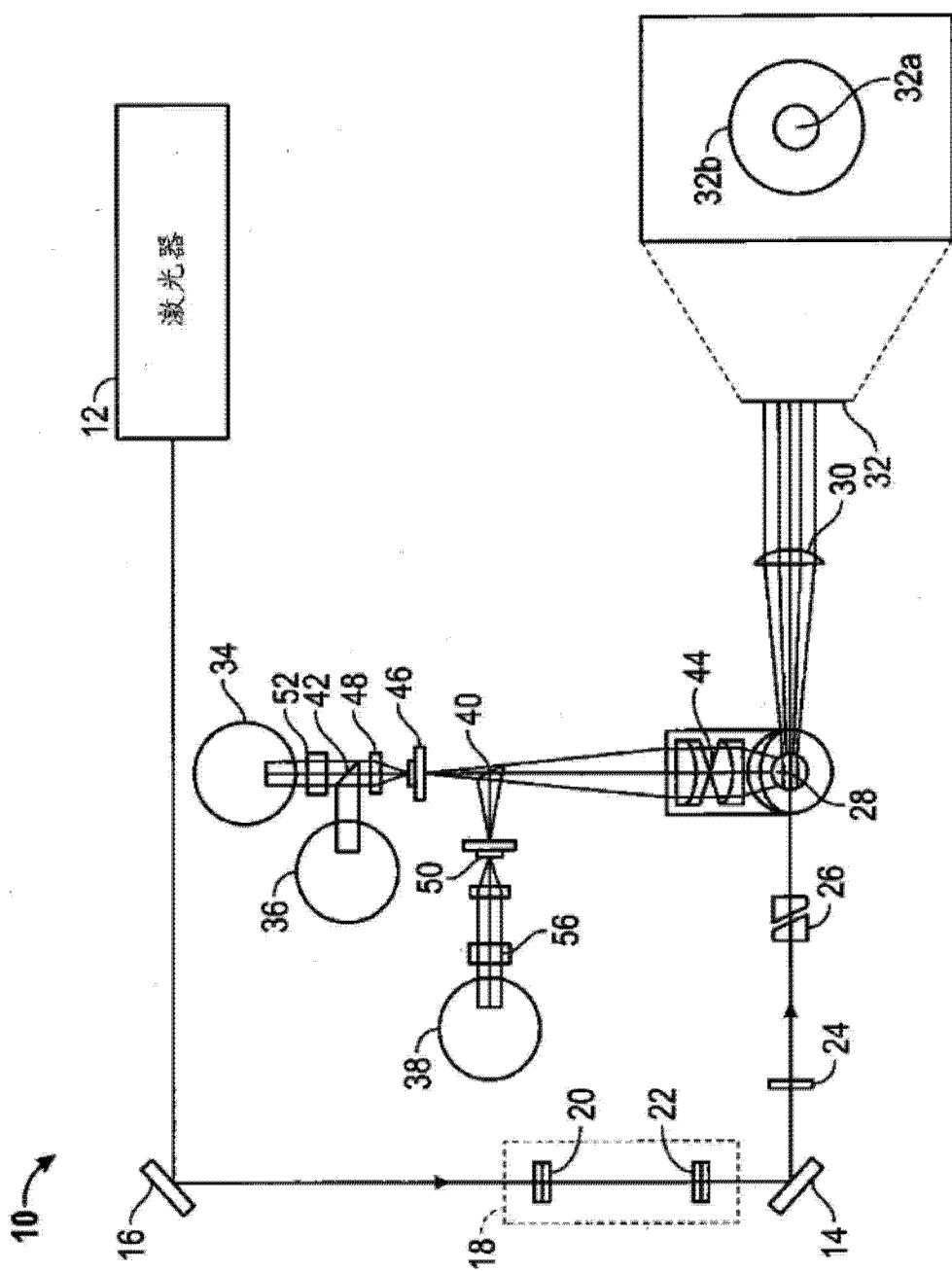


图 14