

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03107946.6

[51] Int. Cl.

G01N 15/02 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 21/85 (2006.01)

G01N 21/47 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1327208C

[22] 申请日 2003.3.25 [21] 申请号 03107946.6

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 25 [33] JP [31] 83457/02

[73] 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本神户市

[72] 发明人 小筱正继 井上淳也 福田正和

[56] 参考文献

EP0398522A2 1990.11.22

US2002/0020207A1 2002.2.21

US4781459A 1988.11.1

EP0214614A2 1987.3.18

US4523841A 1985.6.18

JP7-82010A 1995.9.6

JP61-266959A 1986.11.26

US5891733A 1999.4.6

US5757475A 1998.5.26

审查员 贺文晶

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 赵苏林 郭广迅

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 3 页

[54] 发明名称

粒子分析仪用包裹液

[57] 摘要

一种粒子分析仪用的包裹液，在 25℃、钠 D 线波长处的折射率为 1.3340 或更高。

1. 一种粒子分析仪用包裹液，用于分析生物样品中所含的粒子，所述包裹液在 25℃、钠 D 线波长处折射率为 1.3340~1.3450，

所述包裹液包含至少一种选自下列的组分：缓冲剂、渗透压补偿剂、表面活性剂、螯合剂和杀真菌剂/杀菌剂，所述组分含于有机溶剂、水或其混合物中，

所述粒子分析仪的光源的波长为 500nm~800nm。

2. 权利要求 1 的包裹液，其中缓冲剂使包裹液的 pH 值维持在约 6.0~8.5 的范围内。

3. 权利要求 2 的包裹液，其中缓冲剂选自三羟甲基氨基甲烷缓冲液、Good's 缓冲液、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、盐酸-佛罗那钠、可力丁-HCl、三(羟甲基)氨基甲烷-HCl。

4. 权利要求 1 的包裹液，其中表面活性剂选自聚氧乙烯烷基醚型表面活性剂、聚氧乙烯烷基苯基醚型表面活性剂、聚氧乙烯脱水山梨醇烷基酯型表面活性剂、具有羟端基的多元醇共聚物、MEGA-8、蔗糖单癸酸酯、脱氧-BIGCHAP、正辛基-β-D-硫代葡糖苷、正壬基-β-D-硫代麦芽糖苷、正庚基-β-D-卤代葡糖苷、正辛基-β-D-硫代葡糖苷、CHAPS 和 CHAPSO。

5. 权利要求 1 的包裹液，其中表面活性剂的使用浓度介于约 50~5000 mg/L。

6. 权利要求 1 的包裹液，其包含：1 kg 纯水、20~78 g 氯化钠、5~50 mM 马来酸、5~50 mM 三(羟甲基)氨基甲烷、0.05~5 w/w%EDTA-2K、作为非离子表面活性剂的 0.05~5 g 聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单油酸酯，以及 0.1~3.0 g 2-苯氧基乙醇。

7. 权利要求 1 的包裹液，其包含：1 kg 纯水、20~78 g 氯化钠、5~50 mM 马来酸、5~50 mM 三(羟甲基)氨基甲烷以及 0.05~5 w/w%EDTA-2K。

8. 权利要求 1 的包裹液，其中粒子分析仪包括流式细胞计。

9. 权利要求 1 的包裹液，其折射率在样品折射率的±0.5%之内。

10. 一种粒子分析方法，用于分析待用流式细胞计分析的生物样品中的粒子，包括：

用在 25℃、钠 D 线波长处的折射率为 1.3380~1.3450 的包裹液

包封生物样品，所述包裹液包含至少一种选自下列的组分：缓冲剂、渗透压补偿剂、表面活性剂、螯合剂和杀真菌剂/杀菌剂，所述组分含于有机溶剂、水或其混合物中；

将由包裹液包封的样品送过流式细胞计的流动池；和
以波长为 500nm ~ 800nm 的光照射流动池中的样品。

11. 权利要求 10 的粒子分析方法，其中采用流式细胞计的粒子分析基于前向散射光。

粒子分析仪用包裹液

相关申请

本申请与 2002-03-25 提交的日本专利申请号 2002-83457 相关，后者的优先权是在 35USC § 119 下要求的，在此将其全部内容收作参考。

技术领域

本发明涉及粒子分析仪用的包裹 (sheath) 液。

背景技术

近年来，涌现出许多采用包裹流动体系来分辨和/或分析细胞或粒子的设备，并且诸如血液、尿液之类生物样品的分辨和分析的自动化程度越来越高，速度越来越快。

包裹流动系统是对细胞或粒子计数和获得其形态信息的技术。细胞或粒子，当它们是或以悬浮体或稀释样品形式存在时，被包裹在包裹液的流股中并以最佳流量和流速逐一通过流式细胞计的流动池。该计数和形态信息是通过探测细胞或粒子从流动池内探测段旁穿过时所产生的电或光脉冲获得的。

例如，含有对象细胞、粒子之类的样品被包裹液流带到探测段，在此，细胞或粒子受到来自激光源的激光束的照射，照射前该光源发出的光先要通过汇聚透镜。发出的光被一种发射光闸阻挡，于是只有从细胞或粒子向前散射的光通过探测前向散射光的透镜被前向散射光探测器探测到。另一方面，侧向散射光通过用于探测侧向散射光的透镜被侧向散射光探测器探测到。探测器探测到的电压值输入到分析器中，该分析器根据电压值生成一种前和侧向散射光的散射图谱，并将散射图谱显示在显示器上和给细胞和粒子计数。

在激光源是红光源，如 He-Ne 激光器这样一种半导体激光器之类的情况下，诸如血液之类的以高稀释系数稀释的样品，不存在任何问题，然而，像尿这样的样品，由于它们原本如此或者是以低稀释系数稀释的，则无法获得准确的分析结果。

更具体地说，在像尿液这种本质上具有高折射率的样品的情况下，样品和包裹液在近红外波长具有相差很大的折射率。结果，前向

散射光信号的基线发生波动，在散射图谱上可能出现一个群，似乎存在许多粒子，而实际上样品中不存在粒子。因此，无法准确计数样品中的粒状组分。

发明内容

本发明的目的是提供一种粒子分析仪用包裹液，它使得具有高折射率的样品即便在采用红光源时仍能准确地分析。

本发明提供一种在 25℃、钠 D 线波长处折射率介于 1.3340，优选 1.3380~1.3450 范围内的粒子分析仪用包裹液。

本申请的上述及其他目的在研读了下面的详细描述之后将显而易见。然而要知道，该详细描述和具体实施例，虽然给出本发明的优选实施方案，但仅仅是为了举例说明，因为在本发明精神和范围内本领域技术人员根据下面的详细描述还可做出各种各样的变化和修改。

附图说明

图 1 是适合应用本发明包裹液的粒子分析仪的示意图。

图 2(a) 是表示基线的图，此时前向散射光信号采用本发明粒子分析仪用包裹液 1 进行测定；以及图 2(b) 是采用本发明包裹液 1 测定的前向散射光的散射图谱。

图 3(a) 是表示采用传统粒子分析仪用包裹液测定的前向发射光信号基线的图；而图 3(b) 是采用传统包裹液测定的前向散射光的散射图谱。

优选实施方案

本发明包裹液通常用于包封待分析的含粒子样品，并将它们以就采用流式细胞计分析粒子的目的而言最佳的流量和速度送过流式细胞计的流动池。

包裹液的组成不受特定限制，只要样品中的细胞或粒子不受包裹液的影响，并且可根据样品的种类和浓度以及流式细胞计所采用的光源类型等因素进行适当调节。包裹液通常包含，在有机溶剂、水或其混合物中的缓冲剂、渗透压补偿剂、表面活性剂、螯合剂、杀真菌剂/杀菌剂等。本发明包裹液还包含至少一种，优选多种上面提到的组分。

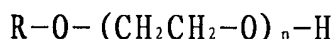
更具体地说，缓冲剂用于将包裹液的 pH 值维持在约 6.0~8.5，优选约 7.0~8.5 的范围。缓冲剂可以是传统上已知的那些，其例子包括三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液、Good's 缓冲液如 MES、Bis-Tris、

ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine 和 TAPS、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、盐酸-佛罗那(veronal)钠、可力丁-HCl、三(羟甲基)氨基甲烷-HCl 等。浓度可根据所用缓冲剂的缓冲能力做适当调节，例如可介于约 5 ~ 50 mM。

渗透压补偿剂用于防止样品中的细胞或粒子发生细胞溶解并维持包裹液的渗透压。其例子包括无机盐如氯化钠、氯化钾、氯化锂等、有机盐如丙酸盐(例如，丙酸钠、丙酸钾、丙酸铵等)，草酸盐、乙酸盐等，以及糖类如山梨醇、葡萄糖、甘露醇等。

表面活性剂不一定要包含于该包裹液中，但可以是阳离子、阴离子、非离子或两性的，只要它们对样品的分析不产生不利影响。表面活性剂优选是非离子的。其优选的例子如下：

-聚氧乙烯烷基醚型表面活性剂(参见日本未审专利出版物号 HEI 8(1996)-122327)，例如下式的那些：



其中 R 是 C_{8-22} 烷基或亚烷基基团，n 是 25 ~ 35 的整数，例如， $C_{12}H_{25}-O-(CH_2CH_2-O)_{30}-H$ 、 $C_{18}H_{35}-O-(CH_2CH_2-O)_{30}-H$ 、 $C_8H_{17}-O-(CH_2CH_2-O)_{30}-H$ 和 $C_{22}H_{45}-O-(CH_2CH_2-O)_{30}-H$ ；

-聚氧乙烯烷基苯基醚型表面活性剂(参见日本专利出版物号 HEI 8(1996)-33388)，具有 C_{9-20} 烷基基团和 20 ~ 60 附加摩尔数的聚氧乙烯，例如，Nissannonion NS-240S；

-聚氧乙烯脱水山梨醇烷基酯型表面活性剂(参见日本专利出版物号 HEI 7(1995)-82010)，具有 16 或更高碳原子数的烷基基团和 15 ~ 40 附加摩尔数的聚氧乙烯，例如，RHEODOL TW-0120，由 Kao 公司提供；

-具有端羟基基团的多元醇共聚物(日本未审专利出版物号 SHO 62(1987)-87233)，例如下列通式的那些：



其中 s 和 m 相同或不同，是 39 ~ 77，例如 BASF Wyandotte 公司生产的 Pluronic P-105/P-84/P-85/P-87/P-75 等；

-MEGA-8；

-蔗糖单癸酸酯；

-脱氧-BIGCHAP;

-正辛基- β -D-硫代葡萄糖苷、正壬基- β -D-硫代麦芽糖苷、正庚基- β -D-卤代葡萄糖苷、正辛基- β -D-硫代葡萄糖苷;

-CHAPS、CHAPSO等。这些表面活性剂可以约50~5000 mg/L, 优选约100~3000 mg/L的浓度使用。

螯合剂可用于溶解存在于样品中的无定形盐(例如, 硫酸铵、镁、碳酸钙)和抗氧化。其例子包括EDTA盐、CyDTA、DHEG、DPTA-OH、EDDA、EDDP、GEDTA、HDTA、HIDA、甲基-EDTA、NTA、NTP、NTPO、EDDPO等。其浓度介于约0.05~5 w/w%。

杀真菌剂/杀菌剂不受特定限制, 其可用例子包括三嗪抗微生物剂、噻唑抗微生物剂如苯并异噻唑烷酮(benzisothiazolone)(BIT)、二巯基吡啶氧化物(PTO)、吡啶抗微生物剂如1-羟基吡啶-2-硫钠、2-苯氧基乙醇等。这些添加剂加入到包裹液中后的浓度应以对样品分析不产生负面影响为准。

合适的有机溶剂是含水有机溶剂, 其例子包括低级链烷醇、低级链烷二醇和低级链烷二醇的一低级烷基醚。尤其是, 可使用甲醇、乙醇、正丙醇、乙二醇、二甘醇、三甘醇、乙二醇单甲醚和乙二醇单乙醚, 它们当中乙二醇和二甘醇以及三甘醇是优选的。乙二醇, 考虑到其对样品中细胞或粒子的影响以及其粘度, 是最优选的。

在本发明中, 包裹液的折射率可通过改变包裹液中每种组分的种类和/或浓度加以调节。例如, 使用约6.2 g/L氯化钠可将包裹液的折射率提高0.001, 而使用约11 g/L乙二醇可将折射率提高0.001。于是, 上面提到的各种添加剂和溶剂可单独或作为其二或更多种的组合以适当浓度使用, 以便样品中包含的各组分, 例如, 细胞、粒子以及其他组分将不受到负面影响。

本发明包裹液在25°C、钠D线波长($\lambda=589.3$ nm)的折射率被调整到等于待分析样品的折射率。这里, 术语“等于”是指包裹液的折射率在样品折射率的 $\pm 0.5\%$, 优选 $\pm 0.3\%$ 范围内。

待分析样品不受特定限制, 但以生物样品为宜, 更具体地是血液和尿液、脊髓液(spinal fluid)等。合适的样品在25°C、钠D线波长的折射率等于1.3340或更高, 优选介于1.3380~1.3450, 更优选约1.3400~1.3420。本发明包裹液尤其可用于分析尿液, 而尿液样品的

折射率优选介于 1.3380 ~ 1.3450。

在本发明中的折射率基于钠 D 线波长的折射率。因此，在流式细胞计采用约 500 nm 或更高的波长或约 500 ~ 800 nm 波长的光源 (He-Ne 激光器，红色半导体激光器等) 时，包裹液可具有样品在所用光源波长的折射率。另外，包裹液的折射率可等于样品不是在 25℃，而是，考虑到样品中可能发生的反应或其他因素而让包裹液和样品在，例如约 25 ~ 45℃ 的温度通过流动池。

按照本发明，样品中包含的粒子可采用如图 1 所示典型的流式细胞计分析。首先，阀 1 和阀 2 打开特定的时间以便使样品从吸入嘴 3 借助来自废液室的负压引入到阀 1 和 2 之间的路径中。随后，阀 1 和 2 关闭且注射器 4 推出液体，借此从样品嘴 6 送入样品，与此同时，阀 8 打开以便使包裹液从包裹液室 9 送入到流动池 5 的室 7。借此，由于室 7 的内径的缘故，样品变得很细，从而与包裹液一起形成一股包裹流。随后，包裹流通过小孔 11。小孔 11 由光学玻璃构成 (包括石英玻璃)，呈内部约 100 ~ 300 微米宽的棱镜形状。包裹流的此种形成过程使得粒子沿直线逐个流过小孔 11 的中心。穿过小孔 11 的粒子通过安装在室 7 上的收集管 14 与包裹液一起排出。

几乎要流到小孔 11 中心处的样品 26 受到激光束的照射。该激光束由激光器 17 发出并借助汇聚透镜 18 聚焦为椭圆形断面。更具体地说，激光束汇聚成这样的断面：它具有一个尺寸几乎等于沿样品流动方向细胞或粒子的直径，同时它还具有一个尺寸，沿垂直于样品流动方向和发出的激光束的光学轴线远大于细胞或粒子的直径。例如，激光束沿样品流动方向为约 10 μm ，而沿垂直于样品流动和射出激光束光学轴线的方向则为约 150 ~ 300 μm 。照射样品流的激光束当中，那些没有撞击到细胞或粒子 (物质目标) 的光穿过流动池 5 而被光束闸 19 阻挡，与此同时撞击到细胞或粒子 (物质目标) 并沿小角度散射，即，前向散射光，被收集透镜 20 收集并穿过遮光板 30 的针孔 21。随后，该前向散射光到达二向色镜 22，将该前向散射光反射。于是，前向散射光被光二极管 31 接受并转换为电信号 28，即作为输出。

输出电信号是分析仪的输入，分析仪通过标绘与前向发射光对应的信号值显示散射图谱，以便借此对细胞或粒子计数。

本发明包裹液可用于测定，一般性地说，凡是能用市售流式细胞

计测定的散射光。该散射光包括小角度前向散射光(例如,接受角介于0~小于5°的情况)、大角度前向散射光(例如,接受角介于约5~20°)、侧向散射光(接收角为约90°)等。本发明包裹液尤其可用于测定前向散射光。

本发明还包括(1)用作粒子分析仪的包裹液,用于包封以流式细胞计测定的样品中包含的粒子,并将粒子送过流式细胞计的流动池,该包裹液在25℃、钠D线波长具有等于样品的折射率,(2)制备粒子分析仪使用的包裹液的方法,该包裹液用于包封以流式细胞计测定的样品中包含的粒子,并将粒子送过流式细胞计的流动池,该包裹液在25℃、钠D线波长具有等于样品的折射率,该方法包括将包裹液在25℃、钠D线波长处的折射率调节到等于样品的折射率,以及(3)一种粒子分析方法,包括,用流式细胞计分析待分析样品中包含的粒子,用在25℃、钠D线波长具有等于样品的折射率的包裹液包封粒子,并将粒子送过流式细胞计的流动池。

本发明粒子分析仪用包裹液将通过实例加以描述。

制备具有下列组成的包裹液,作为待分析样品用于以流式细胞计分别分析,即一种已通过0.22 μm过滤器过滤从中去掉粒状组分的尿样。该尿样在25℃、钠D线波长具有1.3419的折射率。

表1

包裹液1

组分	数量*	作用
纯水	1 kg (1.0 L)	
NaCl	53.0 g	折射率调节
马来酸	0.5 g	pH调节
三(羟甲基)氨基甲烷	1.51 g	pH调节
EDTA-2K	0.2 g	抗氧化
聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单油酸酯(非离子表面活性剂)	1.5 g	脱泡
2-苯氧基乙醇	1.0 g	杀真菌
折射率	1.3420	
pH	7.8	

包裹液 2

组分	数量
纯水	1 kg (1.0 L)
NaCl	20 ~ 78 g
马来酸	5 ~ 50 mM
三(羟甲基)氨基甲烷	5 ~ 50 mM
EDTA-2K	0.05 ~ 5 w/w%
聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单油酸酯(非离子表面活性剂)	0.05 ~ 5 g
2-苯氧基乙醇	0.1 ~ 3.0 g
折射率	1.338 ~ 1.345
pH	7.8

包裹液 3

组分	数量
纯水	1 kg (1.0 L)
NaCl	20 ~ 78 g
马来酸	5 ~ 50 mM
三(羟甲基)氨基甲烷	5 ~ 50 mM
EDTA-2K	0.05 ~ 5 w/w%
折射率	1.338 ~ 1.345
pH	7.8

为进行比较, 制备日本专利出版物号 HEI 7(1995)-82010 的包裹液。该包裹液的性能测定结果表明: nD(折射率)等于 1.335; pH 值, 7.2。

包裹液 1 和对比例的包裹液被用于采用备有 633 nm 波长光源的流式细胞计测定尿液的前向散射光。测定结果示于图 2(a) 和 3(a) 中。

图 2(a) 显示, 按照本发明, 前向散射光基线的波动得到抑制, 因为包裹液 1 的折射率基本上等于尿液的。结果, 如图 2(b) 的散射图谱所示, 尿液中假组分的计数受到限制, 并且尿液得以准确地分析。

相比之下, 采用传统包裹液, 在前向发射光基线中观察到大波动,

如图 3(a)所示，归因于包裹液与尿液之间折射率的差异。大量假组分在尿样中被算在内。

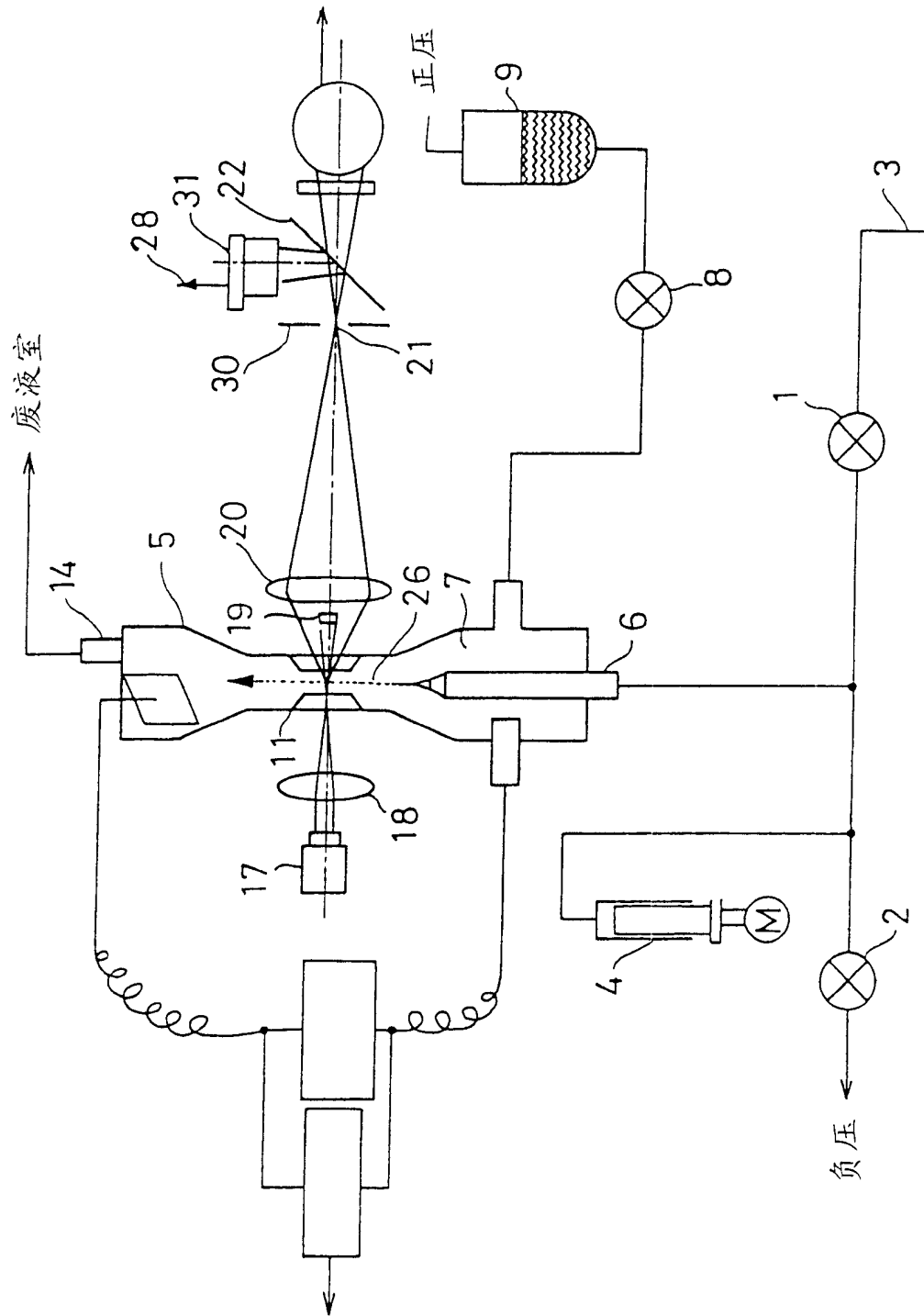


图 1

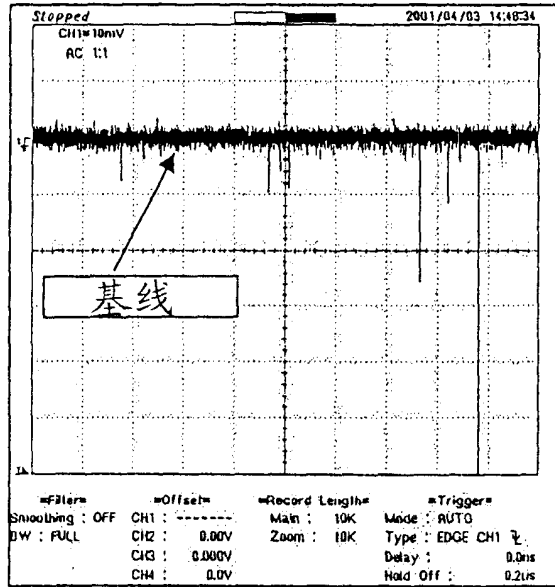


图 2(a)

总计数=1255

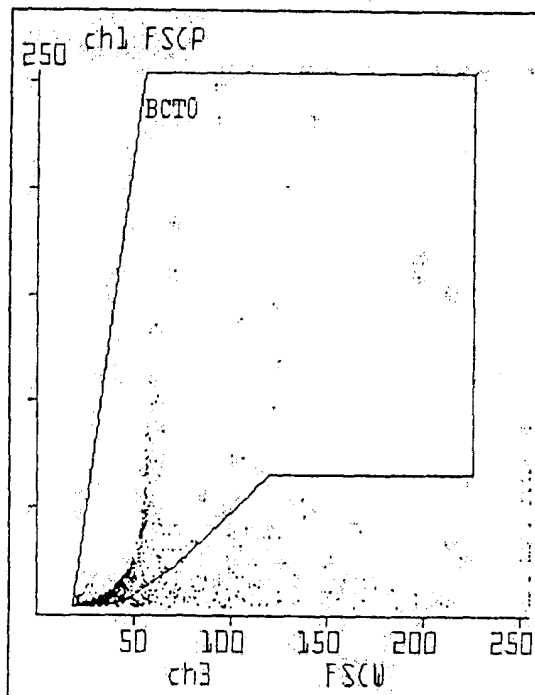


图 2(b)

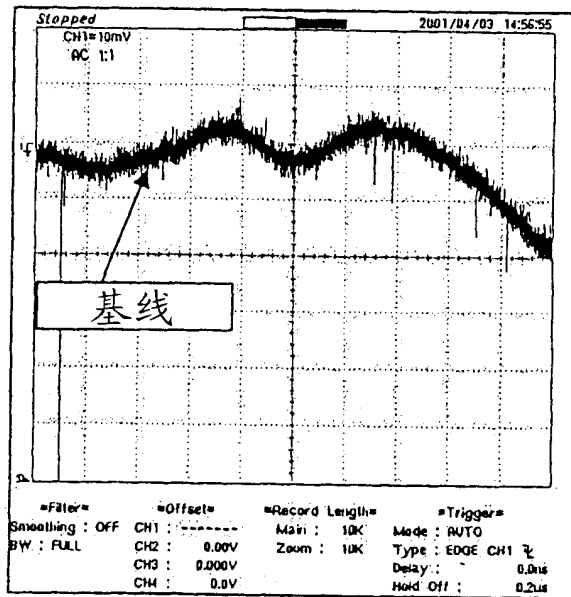


图 3(a)

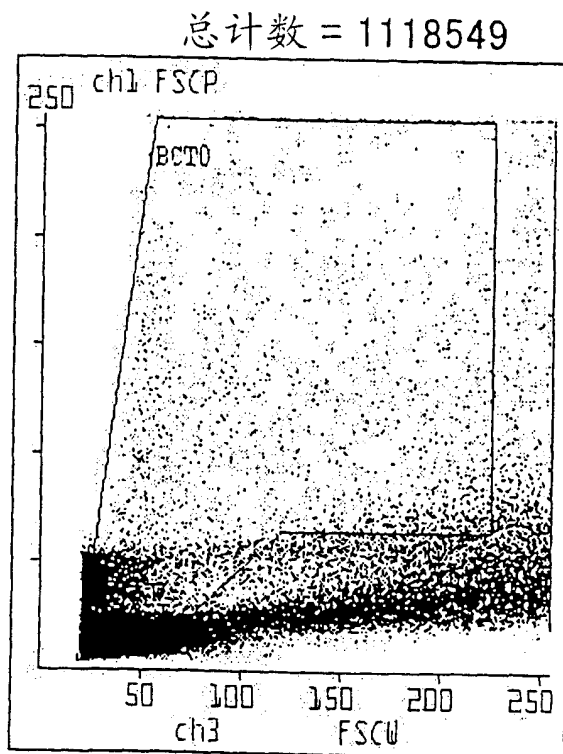


图 3(b)