

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/48

G01N 21/62



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96114487.4

[43] 授权公告日 2003 年 1 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1100265C

[22] 申请日 1996.11.15 [21] 申请号 96114487.4

[30] 优先权

[32] 1995.11.17 [33] JP [31] 299845/1995

[32] 1996.11.8 [33] JP [31] 296654/1996

[71] 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县

[72] 发明人 松本辉也 福田正和

[56] 参考文献

US4767206A 1988.08.30 G01N21/64

US4774189A 1988.09.27 G01N31/00

US4868126A 1989.09.19 G01N31/00

US5073497A 1991.12.17 G01N31/00, G01J3/30

审查员 飞竹玲

[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

代理人 段承恩

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 4 页

[54] 发明名称 流式细胞仪用标准液

[57] 摘要

本发明提供一种流式细胞仪用标准液，该标准液与作为测定对象的细胞显示相同的行为而且无感染的危险性且操作简便。本发明的流式细胞仪用标准液的特征在于含有染色后显示与作为测定对象的细胞大致相同的荧光强度及散射光强度的粒子。

331

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种流式细胞仪用标准液，其特征在于，含有染色后显示出与作为测定对象的细胞大致相同的荧光强度及散射光强度的粒子，其中的粒子是选自下组中的至少1种：球状硅石粒子、液晶隔板(spacer)用硅石、液相色谱仪用充填剂、交联琼脂糖或多孔性硅石。

2. 权利要求1中记载的流式细胞仪用标准液，其中进一步含有荧光灵敏度稳定剂。

流式细胞仪用标准液

技术领域

本发明涉及在流式细胞仪的精度控制以及校准中使用的标准液。更详细地是涉及分析尿中的细胞的流式细胞仪用标准液。

背景技术

为把血液中的细胞和尿中的粒子分类计数，已知有使用流式细胞仪的方法。这种方法就是用染色液将样品试样中的细胞染色后使细胞一个个地在流动池中流动，再用激发光照射被染色的细胞，通过测定从细胞上发出的荧光和散射光进行分类计数。

然而，使用流式细胞仪进行分析时，为获得正确的数据必须要事先校准装置。一般地，将被固定化后的红细胞、细菌等细胞、胶乳粒子、荧光粒子等用于流式细胞仪的精度控制以及校准。例如，在特开平 6-102152 号中记载了使用离子交换树脂的流动式粒子图像解析装置用标准液。另外，在特开平 4-278460 号中记载了将细胞、菌体、胶乳粒子、微囊、淀粉粒子、明胶粒子、花粉作为标记粒子使用。

但是，由细胞和菌体等生物得到的材料，存在着采集样品的个体差异，很难提供稳定的品质。另外，感染病原菌的危险性以及冷藏保存等处理非常麻烦复杂。

因为胶乳粒子一般不可能被染色，所以不能进行染色液的管理。另外，结合有荧光色素的荧光粒子可以进行光学系统的管理，但不能进行染色系统的管理（不仅是染色液本身的管理，还有染色液的分注量的管理以及温度管理等染色条件的管理）。而且，微囊、淀粉粒子、明胶粒子等表现出与作为测定对象的细胞不同的染色状态，可以认为这是由于这些粒子在与染色液中的色素的亲合性这一点上同实际的细胞之间存在差别的缘故。作为校准用物质，具有同作为测定对象的细胞几乎完全相同的行为的物质可以使校准和精度控制容易进行。

另外，上述特开平 6-102152 号是关于将粒子图像摄影，然后从每个粒子图像分析粒子的装置中所用的标准液，而不是关于分析散射光强度及荧光强度的装置所用的标准液。

发明内容

本发明克服了上述先有技术的缺点，本发明的目的在于提供一种具有同作为测定对象的细胞几乎完全相同的行为、且无感染的危险性、使用简便的流式细胞仪用标准液。

为达到上述目的，本发明的发明者们进行了深入的研究，成功地开发出了不采用由生物得到的材料的、可被染色液染色的、并含有与测定对象具有相同行为的粒子的标准液。

也就是说本发明提供了一种流式细胞仪用标准液，其特征在于含有染色后能显示同作为测定对象的细胞几乎完全相同的荧光强度及散射光强度的粒子。

作为测定对象的样品试样是血液、尿液等体液。作为这些体液的成分，例如在血液中含有红细胞、白细胞、血小板等，在尿液中含有红细胞、白细胞、上皮细胞、柱状细胞等。另外，在尿液中还含有由于局部感染或全身感染而带来的细菌、真菌、病原虫、寄生虫等微生物，在肾衰时还会含有由化学物质、药物或游离的脂肪形成的结晶。这些成分就是作为本发明测定对象的细胞。

本发明的标准液中含有染色后能显示同作为测定对象的细胞几乎完全相同的荧光强度及散射光强度的粒子。本发明的标准液中使用的粒子要选择能够吸附一定量的色素的粒子，该一定量的色素是指能够获得与作为测定对象的细胞同程度的荧光强度。

另外，关于粒子大小，可以使用同作为测定对象的细胞相同程度大小的粒子，但因散射光强度不仅反映粒子大小，而且也反映粒子的表面状态，所以未必要使用同样大小的粒子。

如果在本发明的标准液中进一步添加荧光灵敏度稳定剂，则可长时间防止保存时粒子染色状态的变化即荧光灵敏度的变化，因而使用非常方便。即使在无荧光灵敏度稳定剂的情况下，室温下粒子的染色状态

也可稳定 3 个月左右，但添加稳定剂后会更加稳定（例如，室温下可保存 8 个月以上）。

作为荧光稳定剂，最好是水溶性有机溶剂，例如醇类、二醇类较适合。具体可以使用甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、乙二醇、二乙二醇等，优选使用乙醇。使用浓度优选在 5~15w/w% 范围内，更优选 6 - 14w/w%。另外，通过添加这些物质，还可以起到抑制杂菌繁殖的作用。

本发明的标准液中使用的粒子优选是球状硅石粒子，特别优选液晶隔板（spacer）用硅石。另外，作为液相色谱仪中使用的填充剂的粒子也适用于本发明的标准液，特别优选交联琼脂糖及多孔性硅石。

例如，以尿中出现的细胞为例，将对于各细胞的优选粒子详细说明如下。

红细胞：

粒径 3 - 15 μm 、优选 5 - 10 μm 的高纯度硅石的球状粒子较为合适。特别优选作为液晶隔板这样的电子材料使用的物质。例如可以使用宇部日东化成（株）制的 HIPRESICA spTM（平均粒径 5.1 μm ）。

白细胞：

粒径 5 - 20 μm 、优选 7 - 15 μm 、细孔径 5 - 100nm、优选 7 - 10nm 的全多孔性硅石较为合适。例如可以采用 GL Science Co. Ltd 制的 Zorbax BP - SILTM（由 ROCKLAND TECHNOLOGIES Inc. 制造粒径 7 - 8 μm ，细孔径 7 - 8nm）。

上皮细胞：

粒径 15 - 300 μm 、优选 20 - 200 μm 、细孔径 5 - 40nm、优选 10 - 100nm 的多孔性硅石较为合适。例如可以使用 MACHERY - NAGEL 制的 NUCL EOPREPTM（平均粒径 30 μm ）。另外，还可以使用纤维素凝胶（テ、ソ（株）制 CellulofimeTM）、亲水性己烯基聚合物凝胶（TOSOH Co. Ltd 制的 Toyopal HWTM）等。

柱状细胞：

粒径 25 - 300 μm 、优选 40 - 200 μm 的交联琼脂糖凝胶较为合适。例如，可以使用 Pharmacia Biotec Co. Ltd 制的 Spharose CL-2BTM、（粒

径 60 - 200 μm)。

细菌:

粒径 0.7 - 5 μm 、优选 1 - 3 μm 的全多孔性球状硅石较为合适。例如可以使用 Pia TEC Co. Ltd 制的 PiaseedTM (平均粒径 2 μm)。

可用于白细胞、上皮细胞、柱状细胞以及细菌的粒子是球状粒子,通常作为液相色谱仪的充填剂而被经常使用的粒子较为合适。另外,未进行过化学修饰的粒子较合适。另外,以上列举只是其中一例,只要染色后的荧光强度及散射光强度与作为测定对象的细胞几乎相同,则对粒径和材料并无特殊限制。

上面举例说明了用于尿中所含细胞成分的粒子,而测定血液时,除含有红细胞、白细胞外,还含有血小板。适用于血小板的粒子例如优选粒径 1 - 5 μm 、最好是 2 - 4 μm 的全多孔性球状硅石。

本发明的流式细胞仪用标准液可以通过将粒子悬浮于水性溶剂中配制而成,该水性溶剂优选是 pH3 - 7 的缓冲液,更优选 pH4 - 5 的缓冲液。另外,根据需要还可添加氯化钠、氯化钾等生理盐类,葡萄糖等糖类,白蛋白、血红蛋白、亚硝酸盐、防腐剂等。

本发明的流式细胞仪用标准液可以通过将一种粒子悬浮于水性溶剂中配制而成,也可根据作为测定对象的样品试样的不同将二种以上的不同粒子混合配制而成。

本发明的流式细胞仪用标准液可以与用其他方法配制的染色液混合使用。染色液是将与作为测定对象的细胞相对应的一种或一种以上的荧光染料溶于乙二醇、二乙二醇、甲醇等溶剂中使用。荧光染料最好是阳离子性色素,例如可以使用碘化 3, 3'-二己基-2, 2'-氧杂喹啉蓝色素、碘化 3, 3'-二甲基-2, 2'-氧杂喹啉蓝色素、碘化 3, 3'-二丙基-2, 2'-氧杂喹啉蓝色素、碘化 3, 3'-二戊基-2, 2'-氧杂喹啉蓝色素等喹啉蓝色素,罗丹明 B, 罗丹明 6G 等罗丹明系色素,能将 DNA 特异性染色的溴化乙锭等色素。

采用本发明的流式细胞仪用标准液进行流式细胞仪的精度控制及校准时,将本发明的流式细胞仪用标准液和染色液混合后,使其在流式细

胞仪的流动池中流动。如将流式细胞仪用于测定尿样时，可以使用东亚医用电子株式会社制的全自动尿中有形成分分析装置 UF-100，另外，如用于测定血液试样时，可使用东亚医用电子株式会社制的自动网织红细胞测定装置 R 系列。

以尿试样测定用标准液的情况为例说明本发明的标准液的使用方法。将激发光照射于流动在流动池中的标准液和染色液的混合液（以下称之为标准试样），测定从标准试样中的有形成分发出的前方散射光和荧光强度。由此可以分析标准试样中含有的有形成分。另外，测定柱状细胞时，如果测定标准试样的电阻信号强度（体积数据），则因为提高了检测灵敏度，因此极为方便。因此，在测定尿样时优选使用可测定电阻信号和光学数据的流式细胞仪。作为适合使用本发明的标准液的流式细胞仪例如有如图 1 所示的装置。

首先，通过打开阀 1 及 2 规定的时间，由于从废液室产生的负压，使试样液从吸引喷嘴 3 注满阀 1 和 2。通过用注射器 4 以一定流量将液体挤压出，由此从试样用喷嘴 6 喷出试样液体，与此同时，通过打开阀 8 就可以向流动池 5 的容器 7 供给鞘流（sheath flow）液。这样试样就如图 1 所示，沿着容器 7 的内径被拉成一条很细的细流，通过测流孔（orifice）11。测流孔的形状是内径的一边为 $100 - 300\mu\text{m}$ 的方柱形，由光学玻璃材料制成（也包括石英玻璃）。通过形成鞘流，就可以使粒子一个个地排成一行从测流孔 11 的中心流过。通过测流孔 11 的试样液和鞘液通过设置在容器 25 上的回收管 14 后被排出。

电极 13 是设在容器 25 内部的白金制的正极，电极 12 是设在容器 7 内部的不锈钢制的负极。该电极 12 与 13 间的电阻由鞘液液的电阻率（导电率）、测流孔的大小（孔横截面积）和孔长度、试样液的电阻率、试样液流动时的直径所决定。

电极 15 是直流稳定电源，供电给电极 12 和 13 之间。通过在电极 12 和 13 之间加上稳定电流，就会产生由电极 12 和 13 间的电阻及电流值决定的直流电压。另外，粒子如果通过测流孔 11，则测流孔 11 两端的电阻会发生变化，所以电阻只有在粒子通过时才增大，电极 12 和 13 之间

产生的电压随之变化，而且产生与通过测流孔 11 的粒子的大小成比例的脉冲式电压，该电压与上述直流电压相叠加，这些电压呈现在电极 12 和 13 之间。并可用放大器 16 检测，输出电阻信号 29。

从激光器 17 发出的激光通过会聚透镜 18 后被会聚成椭圆状照射到处于测流孔 11 的大致中心的样品流 26 上。在试样流动方向上激光的形状较窄，与血细胞粒径大致相同，例如为 $10\mu\text{m}$ 左右。在与试样流动方向及照射光轴方向相垂直方向上的形状比血细胞粒径宽得多，例如为 $150 - 300\mu\text{m}$ 左右。照射到样品流 26 上的激光如没遇到细胞（有形成分）就直接透过流动池 6 被透过光光束限制器 19 所遮挡。如照射到细胞（有形成分），在狭窄角度内发散的前方散射光及前方荧光通过会聚透镜 20 聚光，通过遮光板 30 的针孔 21。然后，透过二向色板 22 和滤光器 23 进一步除去散射光后用光电倍增管（PMT）24 检测，变换成电信号 27 后输出。散射光被二向色板反射，由光电二极管 31 接受散射光并变换成电信号 28 后输出。

已经证明使用上述流式细胞仪用标准液按照上述方法进行分析时可以显示出与作为测定对象的细胞大致相同的行为，可以用于流式细胞仪的校准。

如果将本发明的流式细胞仪用标准液和染色液混合，则使色素吸附在粒子上，由于吸附量而发出荧光。

在本发明的流式细胞仪用标准液中使用这样一种粒子，该粒子可吸附能够显示与作为测定对象的细胞同等程度荧光强度的色素量。另外，对于粒子大小，可以使用与作为测定对象的细胞同等程度大小的粒子，但因散射光强度不仅反映粒子大小，而且也反映粒子的表面状态，所以未必要使用同样大小的粒子。

例如，将细胞染色时，使用了阳离子性色素，但红细胞与其他细胞相比染色性差。因此，作为红细胞的代用粒子，不能使用完全不吸附色素的粒子，优选使用不怎么吸附色素的粒子，可以使用能吸附达到与红细胞同等程度的荧光强度的色素量的粒子。粒子的大小可以采用与实际的红细胞大小（ $3 - 10\mu\text{m}$ ）相近的粒子。而且，即使大小有些不同，只

要散射光强度与红细胞大致相同就可以。

另一方面，因为白细胞和上皮细胞可被强烈染色，所以可以使用吸附能够显示与这些细胞同等程度的荧光强度的色素量的粒子作为白细胞和上皮细胞的代用粒子。对于粒子大小，与红细胞情况相同虽然可以使用与实际大小（白细胞：3-15 μm ，上皮细胞：15-150 μm ）相近的粒子，但只要散射光强度与各自的细胞大致相同，也可以使用大小多少有些不同的粒子。

另外，对于柱状细胞，实际上有含包涵物及不含包涵物两种，本发明的标准液可以使用作为任何一种柱状细胞的代用粒子。作为粒子，与其他细胞相同，可以吸附能够显示与含有实际包涵物的柱状细胞同等程度的荧光强度的色素量，对于大小，可以使用与实际大小（100 μm 以上）相近的粒子，但只要散射光强度大致相同即可。

对于细菌（大小：1-3 μm ）的代用粒子，可以使用那些可以吸附能够显示与实际的细菌同等程度的荧光强度的色素量的以及与细菌的散射强度大致相同的粒子。

附图的简单说明：

图 1：流式细胞仪的简图。

图 2：使用本发明的标准液得到的前方散射光强度和荧光强度的二维散射图，可以分类、计数对应于红细胞、白细胞及细菌的粒子。

图 3：使用本发明的标准液得到的荧光脉冲宽度和散射光脉冲宽度的二维散射图，可以分离、计数对应于上皮细胞和柱状细胞的粒子。

图 4：使用本发明的标准液得到的前方散射光强度和荧光强度的二维散射图，可以分离、计数对应于红细胞和细菌的粒子。

图 5：使用尿试样得到的前方散射光强度和荧光强度的二维散射图，可以观察到红细胞、白细胞和细菌。

图 6：使用尿试样得到的前方散射光强度和荧光强度的二维散射图，可以观察到上皮细胞。

图 7：使用尿试样得到的前方散射光强度和荧光强度的二维散射图，可以观察到红细胞和细菌。

下面以实施例更详细地说明本发明,但本发明的范围并不仅限于此。

实施例 1: 尿样测定用标准液的测定

配制具有以下组成的用于尿样测定的标准液及染色液。

<标准液>:

HIPRESICA SP™	40 个/ μ l
(平均粒子直径 5.1 μ m, 红细胞用、宇部日东化成(株)制)	
Zorbax BP-SIL™	40 个/ μ l
(粒径 7-8 μ m, 白细胞用, GL Science Co. Ltd 制)	
NUCLEOPREP 100-30™	40 个/ μ l
(平均粒径 30 μ m, 上皮细胞用, MACHERY-NAGEL 制)	
Sepharose CL-2B™	2 个/ μ l
(粒径 60-200 μ m, 柱状细胞用, Pharmacia Biotec Co. Ltd. 制)	
Pia seed S-150™	40 个/ μ l
(平均粒径 2 μ m, 细菌用, Pia TEC Co. Ltd 制)	
氯化钠	10g/L
叠氮化钠	1g/L
50mM 柠檬酸缓冲液 pH4.0, 电传导率 13ms/cm	

首先配制只含各种粒子的浓分散液,在以下条件下测定粒子数后稀释成上述的粒子浓度后混合,配制成上述标准液。

<染色液>:

染色用试剂:

碘化 3, 3'-二己基-2, 2'-氧杂喹啉蓝色素	0.144w/w%
溴化乙锭	0.036w/w%
乙二醇	99.820w/w%

染色用稀释液:

HEPES	1.165w/w%
氢氧化钠	0.036w/w%
EDTA-3K	0.391w/w%
加蒸馏水至 100%	

将标准液：染色用试剂：染色用稀释液按 400: 40: 1160 (μl) 的比例混合，在反应温度 35°C 、染色时间 10 秒钟的条件下用 UF-100 (东亚医用电子株式会社制) 进行测定。

图 2 是前方散射光强度和荧光强度的二维散射图，可以分离、计数对应于红细胞、白细胞以及细菌的粒子。

图 3 是荧光脉冲宽度和散射光脉冲宽度的二维散射图，可以分离、计数对应于上皮细胞的粒子和在图的上部的柱状细胞的大粒子。

图 4 是前方散射光强度与荧光强度的二维散射图，可以分离、计数对应于红细胞及细菌的粒子。

然后采用实际的尿试样，与上述相同地加入染色液进行测定。所得结果如图 5-7 所示。图 5 是对应图 2 的散射图，可以在与图 2 大致相同的位置处观察到红细胞和细菌。另外还可以在比图 2 稍高的部分上观察到白细胞集团，还可在其下部观察到稀稀拉拉的细胞膜受损的白细胞。这一部分与图 2 的白细胞大致对应。

图 6 是对应图 3 的散射图，可以在与图 3 大致相同的位置处观察到上皮细胞。而且可以看出这个尿样中无柱状细胞。

图 7 是对应图 4 的散射图，可以在与图 4 大致相同的位置处观察到红细胞和细菌。

在各图中，Fsc 表示前方散射光强度，F1 表示荧光强度，F1w 表示荧光脉冲宽度，Fscw 表示散射光脉冲宽度，RBC 表示红细胞，WBC 表示白细胞，BACT 表示细菌，EC 表示上皮细胞，CAST 表示柱状细胞。

实施例 2：尿测定用标准液的测定

<标准液>:

HIPRESICA spTM 200 个/ μl

Zorbax BP · SILTM 200 个/ μl

NUCLEOPREP 100-30TM 800 个/ μl

Bio · Gela · 5m (Fine)TM 13 个/ μl

(粒径 $38 - 75\mu\text{m}$ ，柱状细胞，Bio-Rad Laboratories 制)

Pia Seed S · 150TM 200 个/ μl

甲酸钠	30.5g/L
盐酸	5.0g/L
乙醇（荧光灵敏度稳定剂）	9.5w/w%
NS·80D TM （异噻唑啉类防腐剂，Nagase Kaseikogyo co., Ltd	
pH4.0 电传导率 25ms/cm	

与实 ytb 例 1 相同，首先配制只含各种粒子的浓分散液，测定粒子数后稀释成上述的粒子浓度后混合，配制成上述标准液。

标准液的测定，在与实施例 1 相同的条件下进行。

图 8 是前方散射光强度和荧光强度的二维散射图，可以分离、计数对应于红细胞、白细胞以及细菌的粒子。

图 9 是荧光脉冲宽度和散射光脉冲宽度的二维散射图，可以分离、计数对应于上皮细胞的粒子和对应于透明柱状细胞的粒子。

图 10 是前方散射光强度和荧光强度的二维散射图，可以分离、计数对应于红细胞及细菌的粒子。

本发明可以提供一种流式细胞仪用标准液，该标准液显示出与作为测定对象的细胞相同的行为，而且没有由细菌等造成的感染的危险性，且操作简便易行。

另外，通过应用二种以上的散射光强度和荧光强度不同的粒子，可以正确地进行灵敏度的调整。例如，可以用灵敏度高的粒子调整至大致的灵敏度后再用灵敏度低的粒子进行微调。

图1

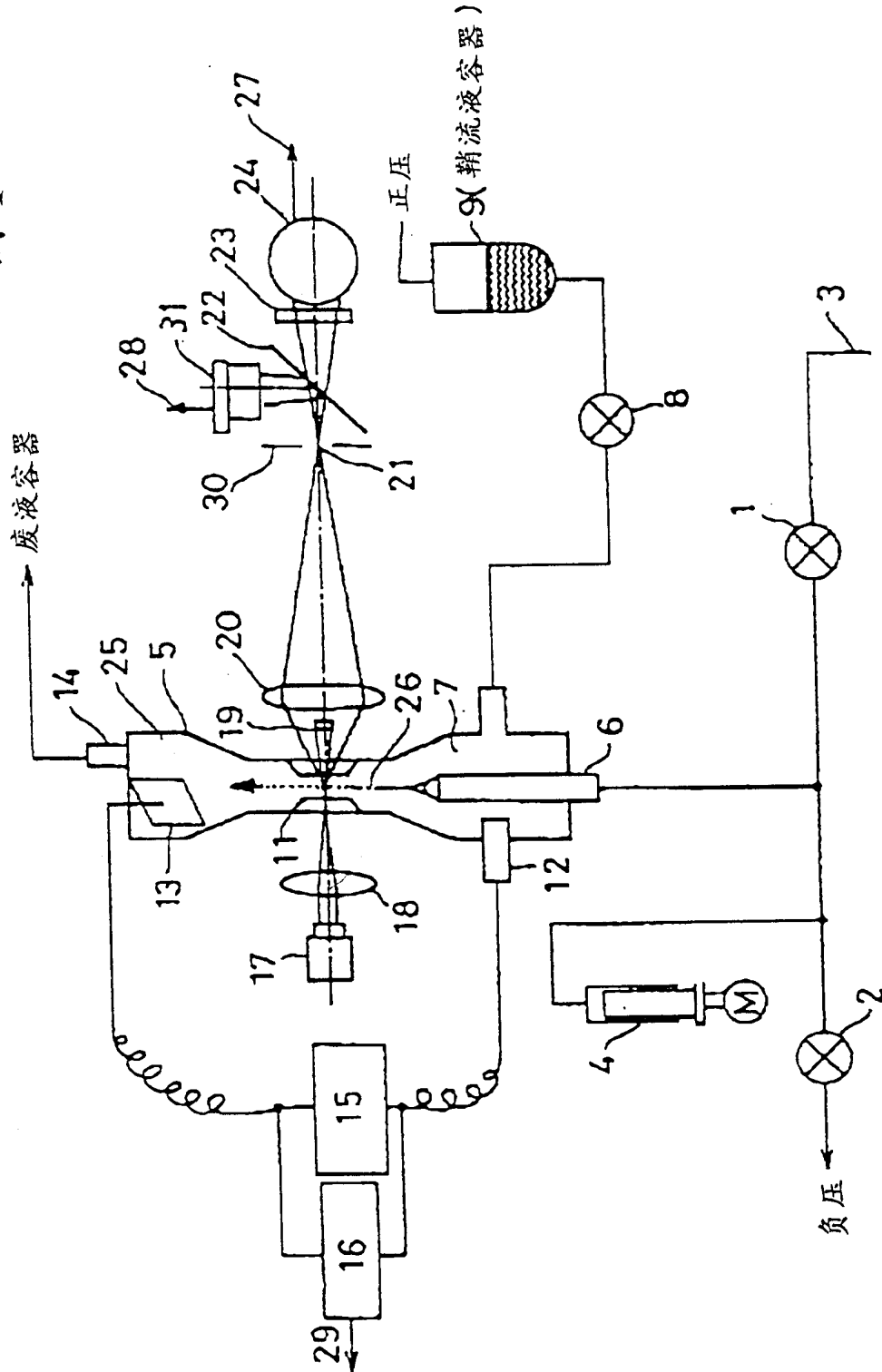


图 2

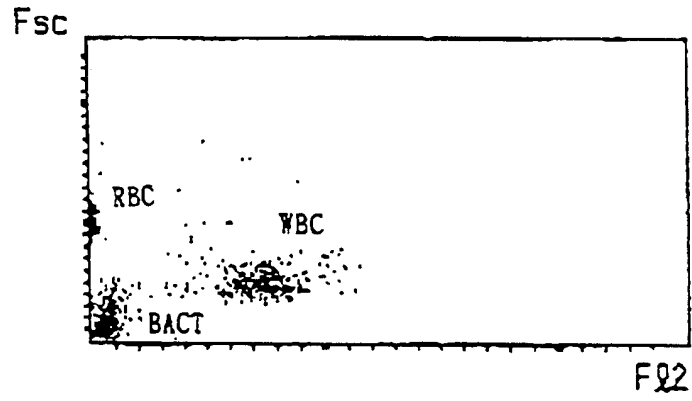


图 3

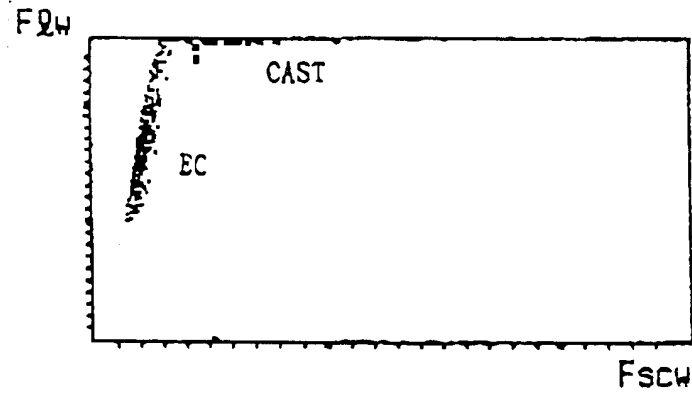


图 4

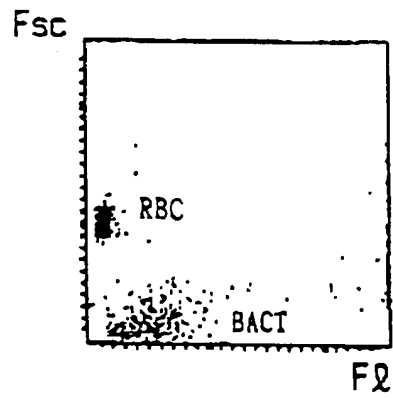


图 5

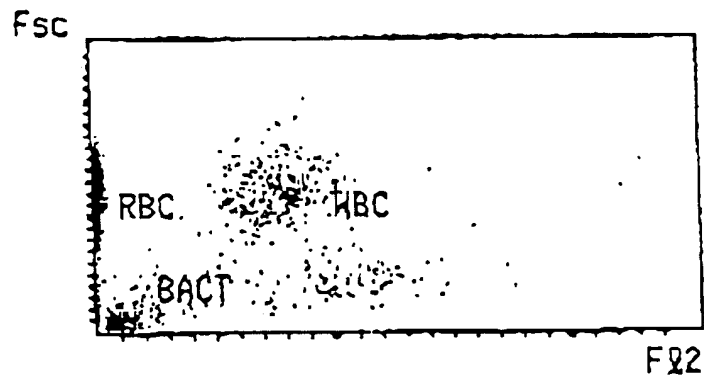


图 6

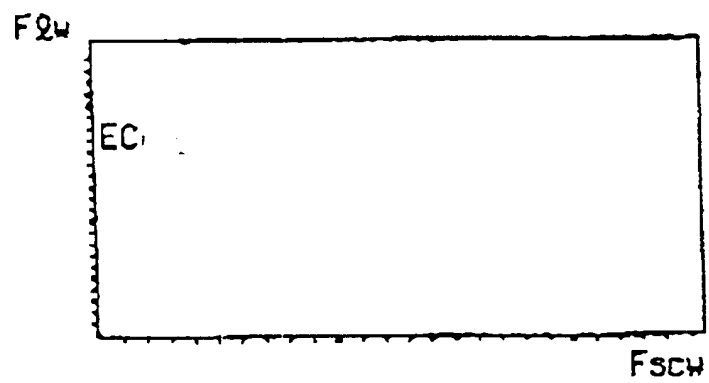


图 7

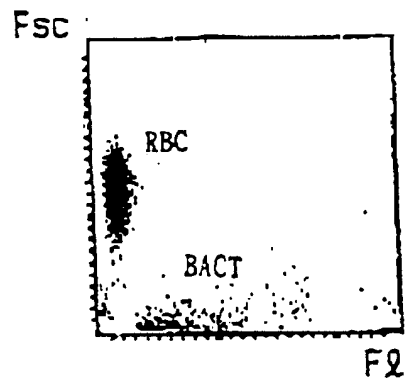


图 8

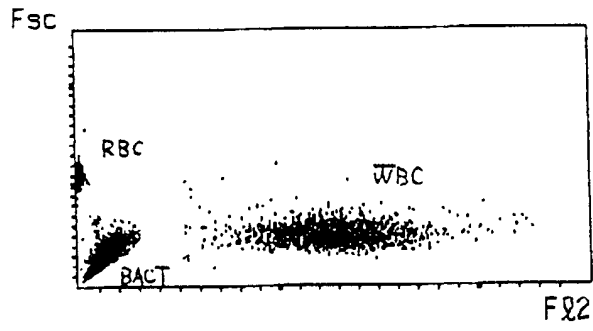


图 9

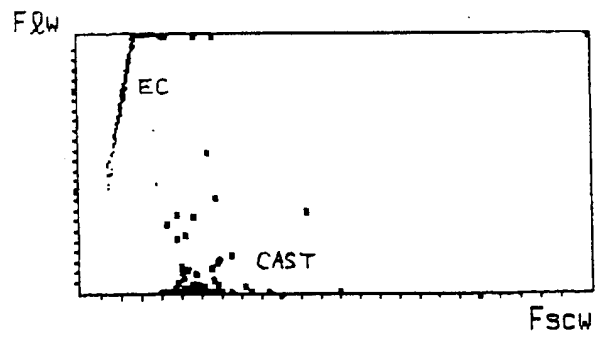


图 10

