



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101231243 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200710073112. X

US 5994138 A, 1999. 11. 30, 说明书第 1 栏第 55 行到第 2 栏第 32 行.

(22) 申请日 2007. 01. 24

审查员 吴宏霞

(73) 专利权人 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科技南十二路迈瑞大厦

(72) 发明人 徐兵 匡玉吉

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 44281

代理人 陈俊斌

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 33/52 (2006. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

C07D 209/14 (2006. 01)

C07D 401/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1172953 A, 1998. 02. 11, 实施例 1-2.

CN 1154966 A, 1997. 07. 23, 实施例 1-10.

US 5411891 A, 1995. 05. 02, 实施例 1-5.

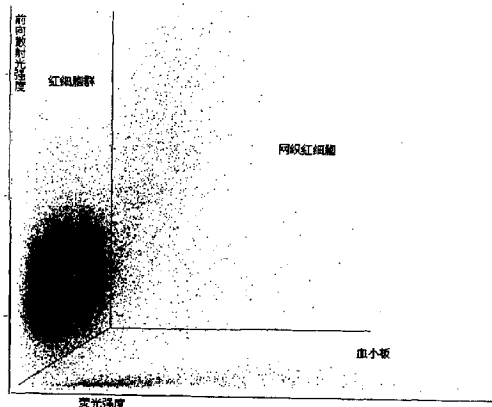
权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

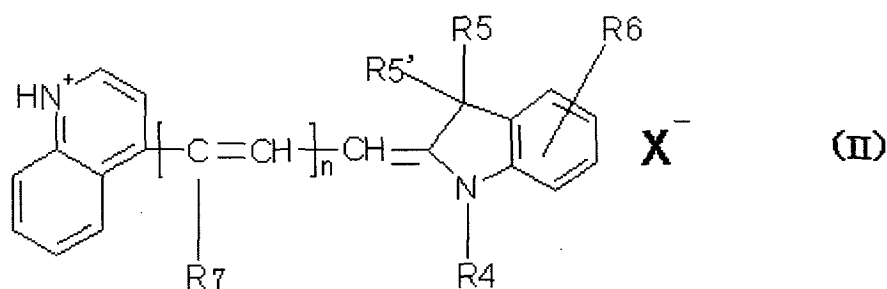
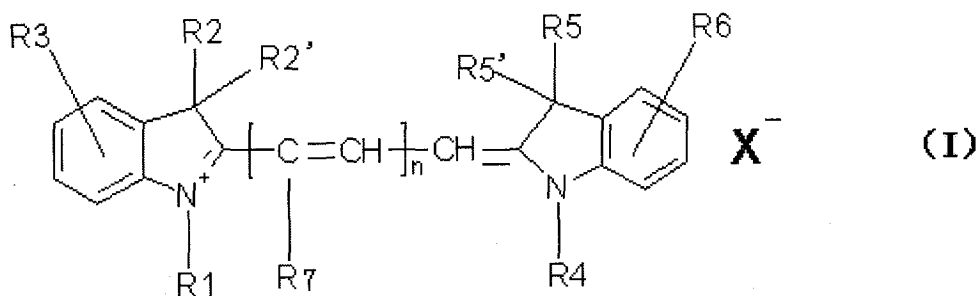
网织红细胞检测试剂及检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种网织红细胞检测试剂及检测方法,所述试剂及方法可以应用在基于流式技术原理的仪器,对血液样本分析中的网织红细胞进行准确计数。本发明的试剂及方法采用一种新型的红色激发荧光染料,用于标记网织红细胞内的 RNA,通过相配的球形化试剂体系,实现在环境温度下对网织红细胞内 RNA 的快速标记。



1. 一种网织红细胞检测试剂,包括红色激发荧光染料,其特征在于:所述红色激发荧光染料具有如下式(I)或(II)所示的结构,



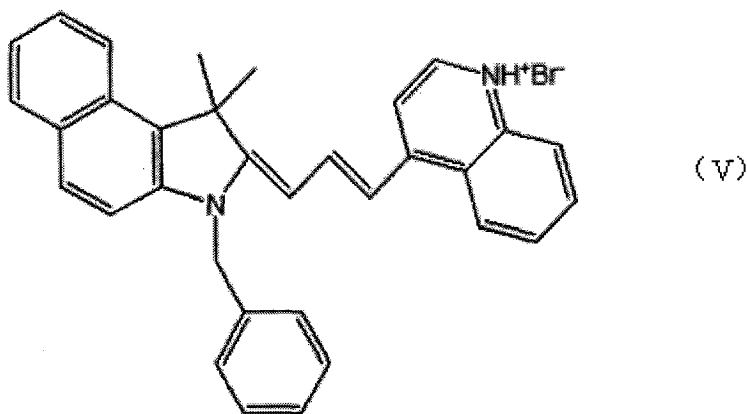
其中, R1、R2、R2'、R3、R4、R5、R5'、R6 可以相同或不相同,表示氢原子、低级烷基、低级烷氧基或带苯环的低级烷基,其中 R6 还可以是苯环,所述低级烷基或烷氧基是指具有 1 ~ 30 个碳原子数的烷基或烷氧基;

R7 为氢原子或氯原子;

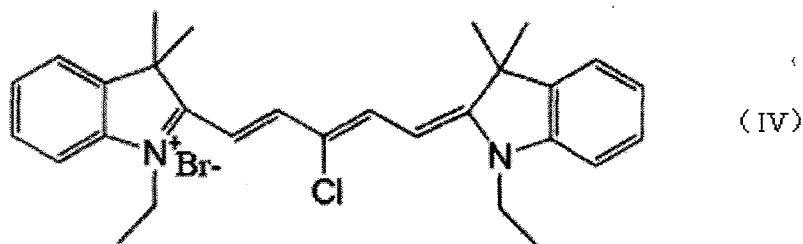
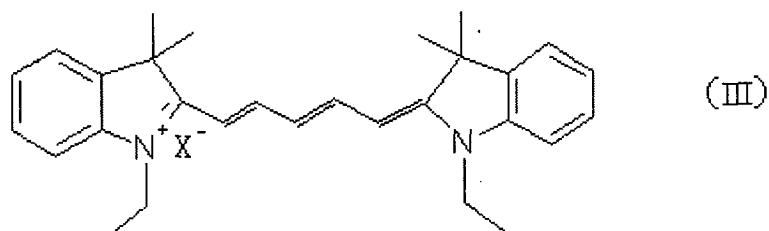
n 为 1 或 2;

X⁻ 为阴离子;

或者所述红色激发荧光染料具有如下式(V)所示的结构,



2. 根据权利要求 1 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述红色激发荧光染料具有如下式(III)或(IV)所示的结构,



3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述检测试剂还包括球形化试剂,所述球形化试剂为两性表面活性剂。

4. 根据权利要求 3 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述球形化试剂选自:烷基甜菜碱、磺基甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱。

5. 根据权利要求 4 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述球形化试剂在检测试剂中的浓度为 5 ~ 2000mg/L。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述检测试剂还包括缓冲液,所述缓冲液调节检测试剂的 pH 值为 5.0 ~ 11.0。

7. 根据权利要求 6 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述缓冲液调节检测试剂的 pH 值为 7.0 ~ 8.0。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述检测试剂还包括荧光染料促染剂,所述促染剂为阳离子表面活性剂。

9. 根据权利要求 8 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述促染剂选自:溴化辛基三甲基铵、溴化癸基三甲基铵、氯化十二烷基三甲基铵、十四烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基氯化铵。

10. 根据权利要求 9 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述促染剂在检测试剂中的浓度为 0.5 ~ 250mg/L。

11. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述检测试剂还包括渗透压调节剂,所述渗透压调节剂调节检测试剂的渗透压为 200mOsm/kg ~ 380mOsm/kg。

12. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种网织红细胞检测试剂,其特征在于:所述检测试剂还包括防腐剂。

13. 一种网织红细胞检测方法,所述方法包括:将权利要求 1 或 2 所述的网织红细胞检测试剂与血液样本混合,反应时间为 10 秒 ~ 1 分钟,之后导入能发射红色区域激光的检测

仪器中进行检测。

14. 根据权利要求 13 所述的一种网织红细胞检测方法,其特征在于:所述网织红细胞检测试剂与血液样本的混合比例为 250 : 1 ~ 1000 : 1。

15. 根据权利要求 14 所述的一种网织红细胞检测方法,其特征在于:所述反应温度为 25℃ ~ 50℃,反应时间为 20 秒 ~ 40 秒。

16. 根据权利要求 13 ~ 15 任意一项所述的一种网织红细胞检测方法,其特征在于:所述红色区域激光的波长为 600 ~ 680nm。

网织红细胞检测试剂及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种细胞检测试剂及方法,特别是涉及一种血液中网织红细胞的检测试剂以及检测方法。

背景技术

[0002] 网织红细胞 (reticulocyte) 是介于晚幼红细胞和成熟红细胞之间的尚未完全成熟的红细胞。网织红细胞计数是评价骨髓造血功能和红细胞生成活力的重要指标。

[0003] 在正常生理情况下骨髓从原始细胞到网织红细胞需 4 天,然后网织红细胞在骨髓中成熟 48 小时进入外周血液,血液中的网织红细胞继续成熟 48 小时变成成熟的红细胞。外周血中网织红细胞数量,对于评价骨髓红系造血及网织红细胞从骨髓到外周血的转送速率有重要意义

[0004] 计数网织红细胞是血液学诊断中评估红细胞生成能力的基础性实验,是贫血的诊断、分型和疗效监测的基础,能够确认骨髓的化疗和移植疗效,监测 EPO(促红细胞生成素)的疗效等。

[0005] 网织红细胞是从骨髓释放到外周血的成熟红细胞的前体细胞,同成熟红细胞相比,其细胞内仍残存少量的 RNA(嗜碱性物质)。测定网织红细胞的基本原理就是用某种染料与细胞内 RNA 结合,再通过显微镜镜检或采用流式细胞术 (FCM) 等方法检测被染色的网织红细胞。根据网织红细胞内 RNA 的含量的多少,将网织红细胞分成不同的成熟度,越是幼稚的网织红细胞内的 RNA 含量越高,越接近成熟的网织红细胞内 RNA 含量越少。

[0006] 网织红细胞的镜检方法是 1949 年建立的利用新亚甲蓝 (NewMethylene Blue, NMB) 活体染色方法。用新亚甲蓝这种染料进行的活体染色被认为是确定网织红细胞的参考方法。目前,国内大多数医院仍采用煌焦油蓝乙醇溶液、煌焦油蓝盐水溶液或新亚甲蓝溶液进行染色、涂片,油镜下直接目测计数 1000 个红细胞中网织红细胞数。这种传统镜检法可以直接观察细胞的形态,又不需要昂贵设备,是诊治贫血的基本实验方法。但是,这种方法,需要在显微镜下人工统计大量的细胞数目(例如 500 到 1000),计数精确性差,而且缓慢、繁琐,受人为因素的干扰较大。

[0007] 仪器分析具有几个优势,如使用自动血液分析仪、流式细胞分析仪等,所计数细胞量大而减少了统计误差,测量速度快而可测定大量样本,重复性好而增加可信性。目前,一般采用碱性色素对网织红细胞内的 RNA 着色,进行识别和计数。一般有两种方法,非荧光标记法,荧光标记法。

[0008] 非荧光方式一般采用两种试剂组合,一种为使红细胞变为等体积的球形化试剂,另一种是如恶嗪 750(Oxazine750) 类染料(美国专利 5, 284, 711 ;5, 633, 167 ;5, 350, 695 ;5, 438, 003 ;5, 360, 739),对网织红细胞进行选择性染色。仪器通过测定光吸收的增加来鉴别于成熟红细胞,光的吸收量与胞内存在的 RNA 量成比例关系,仪器中的激光散射用于检测细胞体积和血红蛋白浓度。由于这类仪器是检测 RNA 与网织试剂沉淀在胞内的光吸收量,而并非荧光,因而克服了流式细胞仪在某些情况下由于红细胞自身产生的荧光而导致

的误差。

[0009] 荧光标记方式是采用 RNA 特异染色的荧光性碱性色素标记网织红细胞内 RNA, 用流式技术测定细胞的前方散射光强度及荧光强度。一般根据荧光强度的差别来辨别红细胞与网织红细胞。红细胞只有背景荧光, 可通过设定一定的“阈值”来界定网织红细胞。由于网织红细胞成熟程度的不同, 细胞内的 RNA 含量不同, 成熟度越高的网织红细胞, 其 RNA 含量越低, 这样可以根据网织红细胞内被荧光标记的 RNA 的多少分成高荧光率 (HFR)、中荧光率 (MRF)、低荧光率 (LFR) 三部分。越是幼稚的网织红细胞显示出越强的荧光, 而成熟的红细胞极少或没有荧光。成熟度不同的网织红细胞内 RNA 含量不同, 标记上的荧光染料量的差异, 而显示出荧光强度的差异, 通过对荧光强度的测定, 可以计算出网织红细胞的成熟指数。荧光染料标记的优势是灵敏度高, 试剂使用量少。

[0010] 流式技术是使用激光照射鞘流液中的血流细胞。由于红细胞是盘状结构, 这样从不同侧面照射和收集发射光时, 红细胞内的荧光染料所产生的荧光强度产生随机差异, 为消除这种差异, 一般采用球形化试剂将红细胞系、血小板等溶胀成等体积的球形, 以尽量消除由于红细胞形状带来的检测误差。

[0011] 通常, 采用前向散射光强度 - 荧光强度分析经网织红细胞试剂处理的血液样本。前向散射光强度反应了细胞的大小情况, 根据细胞大小可以分辨红细胞、白细胞、血小板; 荧光强度则反应细胞内结合了荧光染料量的关系, 可以根据荧光强度分辨网织红细胞和成熟红细胞。由于白细胞内含有大量的核酸物质, 其着色的荧光染料量大大高于网织红细胞, 通过荧光强度也可以有效的分辨网织红细胞与白细胞。

[0012] 荧光染料丫啶橙 (acridine orange) (美国专利 5, 075, 556、5, 360, 739、5, 411, 891、4, 336, 029 等)、金胺 O (Auramine O) (美国专利 4, 985, 174)、噻唑黄 (thiazole orange) (美国专利 4, 957, 870) 等荧光染料已经用于基于流式技术的网织红细胞计数和成熟度分析。这类荧光染料的缺陷是需要使用 He-Ne 等价格较高的激光器激发, 而且生物自身的自发荧光也在这个范围之内, 产生一定的干扰。

[0013] 红色半导体激光器作为一种廉价的光源日益普及, 并且细胞本身在红外区域的几乎没有自发荧光的特点, 因此, 红光激发的荧光染料显示出优势, 并被用于标记血液中网织红细胞, 用红色半导体激光激发后, 进行识别和计数。

[0014] 但是, 早期的应用红色激发荧光染料标记网织红细胞并不成功, 如美国专利 (U. S. Pat. No. 5, 563, 070) (to Yamamoto) 应用红色激发染料 T0-PR0-3 标记网织红细胞, 荧光染料用量大并且血液样本和染料一起要孵育 30 分钟才能标记网织红细胞内的 RNA, 由于染料用量大成本高, 而且样本准备时间长, 不能满足临床分析中样本量大、成本低、分析快速的需求。只有能够快速进入红细胞内, 并对 RNA 进行着色的荧光染料才能满足临床检测对大量样本检测的速度需求。

[0015] 美国专利 U. S. Pat. No. 4, 957. 870 描述一种红色激发荧光染料 (ThiazoleBlue), 其仍然需要接近 30 分钟的孵育时间。

[0016] Akai et al., 美国专利 U. S. Pat. No. 5, 821, 127 描述一种荧光染料, 其可用便宜检测器通过红色区域的荧光检测网织红细胞, 但孵育温度超过 40 度, 而且有对红细胞的非特异性染色, 荧光背景较高, 需要采用试剂组分或软件算法来消除背景荧光带来的影响。

[0017] 美国专利 U. S. Pat. NO. 5, 994, 138 描述用变性剂和离子载体联合红色激发荧光染

料标记网织红细胞的方法,仍需要 35 度以上,并不能在通用环境温度下使用。

[0018] Fan et al., U. S. Pat. No. 5, 411, 891, U. S. Pat. No. 5, 360, 739 描述染料和网织红细胞 RNA 特异的结合常数,染料的渗透速度等由于染料的不同而不同,不可能预测何种染料可以快速穿过红细胞膜而染色网织红细胞。

[0019] SYSMEX US5821127、CN1172953A、CN1154966A 描述一种荧光染料用于网织红细胞自动化分析,该荧光染料对红细胞有显著的非特异结合,不仅结合 RNA,也结合细胞内其他颗粒,比如线粒体,核糖体等,造成荧光背景高的缺陷,而且需要孵育温度 40℃。

[0020] US200203758 描述的荧光染料用于标记网织红细胞、有核红细胞,但其需要孵育长达 1 分钟,并且,标记时间随着环境温度的不同而有所改变,不利于用于血液分析仪中的规范标记,造成一定的误差。

[0021] 因此,需要一种更有效的荧光染料和染色技术,在环境温度下能够快速对细胞内 RNA 进行标记,满足对临床上对网织红细胞快速分析的需要。

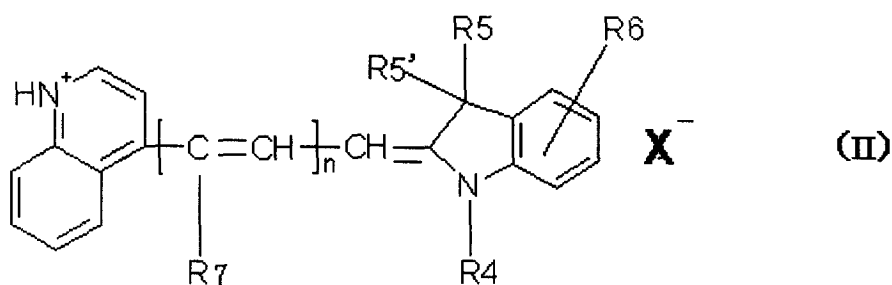
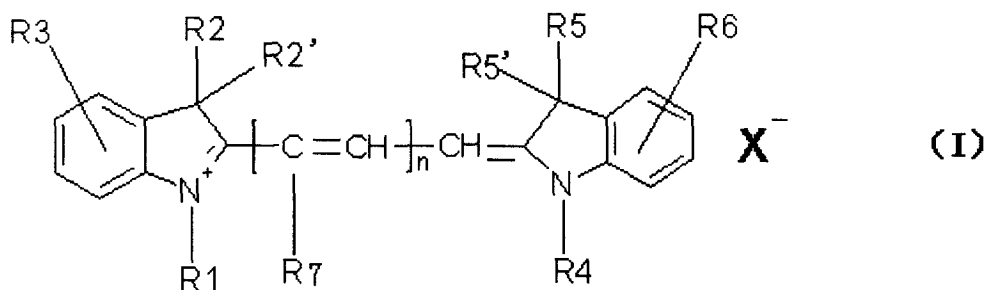
发明内容

[0022] 本发明的目的就是针对现有技术的上述问题,提供一种可利用廉价红色激光检测器进行检测,并能够实现在环境温度下对网织红细胞内 RNA 快速进行标记从而对网织红细胞进行准确测定的试剂及方法。

[0023] 为实现上述目的,本发明采用了以下技术方案:

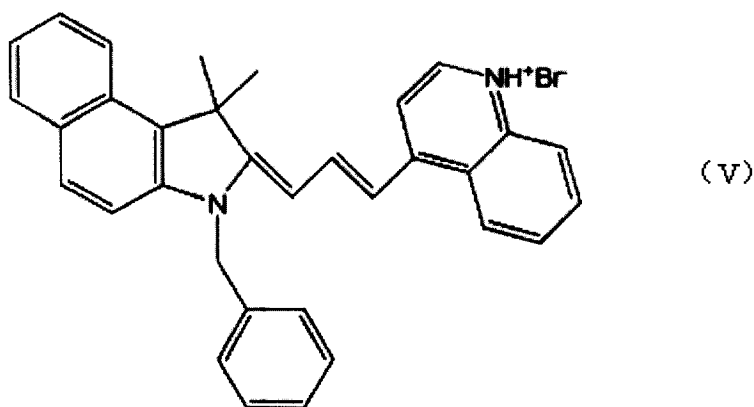
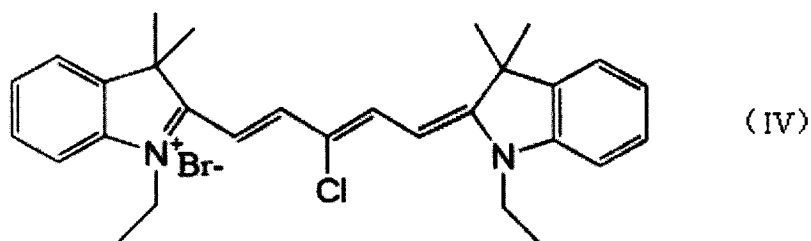
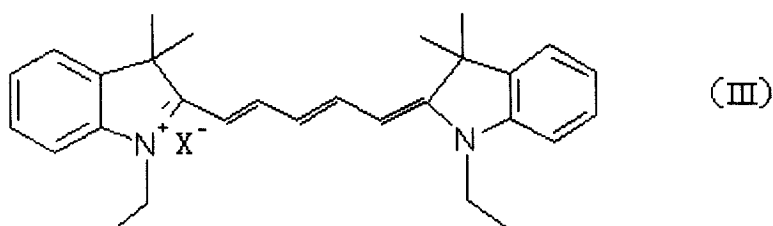
[0024] 本发明公开了一种网织红细胞检测试剂,包括红色激发荧光染料,所述红色激发荧光染料具有如下式 (I) 或 (II) 所示的结构,

[0025]



[0026] 其中, R1、R2、R2'、R3、R4、R5、R5'、R6 可以相同或不相同,表示氢原子、低级烷基、酰基、低级烷氧基或带苯环的低级烷基,其中 R6 还可以是苯环;R7 为氢原子或氯原子;n 为 1 或 2;X⁻ 为阴离子。

[0027] 所述红色激发荧光染料优选具有如下式 (III)、(IV) 或 (V) 所示结构的荧光染料，
[0028]



[0029] 本发明检测试剂还包括球形化试剂，所述球形化试剂为两性表面活性剂。

[0030] 所述球形化试剂优选自：烷基甜菜碱、磺基甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱。

[0031] 所述球形化试剂在检测试剂中的浓度为 5 ~ 2000mg/L。

[0032] 所述检测试剂还包括缓冲液，所述缓冲液调节检测试剂的 pH 值为 5.0 ~ 11.0，优选 pH 值为 7.0 ~ 8.0。

[0033] 所述检测试剂还包括荧光染料促染剂，所述促染剂为阳离子表面活性剂。

[0034] 所述促染剂优选自：溴化辛基三甲基铵、溴化癸基三甲基铵、氯化十二烷基三甲基铵、十四烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基氯化铵。

[0035] 所述促染剂在检测试剂中的浓度为 0.5 ~ 250mg/L。

[0036] 所述检测试剂还包括渗透压调节剂，所述渗透压调节剂调节检测试剂的渗透压为 200mOsm/kg ~ 380mOsm/kg。

[0037] 所述检测试剂还包括防腐剂。

[0038] 本发明还公开了一种网织红细胞检测方法，所述方法包括：将上述的网织红细胞检测试剂与血液样本混合，反应时间为 10 秒 ~ 1 分钟，之后导入能发射红色区域激光的检测仪器中进行检测。

[0039] 优选的，所述网织红细胞检测试剂与血液样本的混合比例为 250 : 1 ~ 1000 : 1。

[0040] 所述反应温度为 25℃ ~ 50℃，反应时间为 20 秒 ~ 40 秒。

[0041] 所述红色区域激光的波长为 600 ~ 680nm。

[0042] 由于采用了以上的方案,使本发明具备的有益效果在于:

[0043] 本发明的网织红细胞检测试剂能够实现在环境温度下对网织红细胞内的 RNA 进行快速标记,染色标记只需 30 秒左右即可完成。本发明的试剂不仅可应用于流式细胞仪检测网织红细胞,还可以采用半导体激光器等廉价设备作为光源的血液细胞分析仪或单独的网织红细胞分析仪分析血液样本中的网织红细胞。本发明的试剂及方法采用规范的孵育温度、使用浓度和作用时间,试剂组合物作用于血液样本后检测的重复性好,非特异荧光背景低,能够广泛应用于血液细胞分析仪中。本发明的检测试剂及方法经过实验,与手工镜检对照,一致性较好。

附图说明

[0044] 图 1 是采用实施例 1 的试剂及方法检测血液中网织红细胞所得前向散射光强度 - 荧光强度的散点图;

[0045] 图 2 是采用实施例 2 的试剂及方法检测血液中网织红细胞所得前向散射光强度 - 荧光强度的散点图;

[0046] 图 3 是采用实施例 3 的试剂及方法检测血液中网织红细胞所得前向散射光强度 - 荧光强度的散点图;

[0047] 图 4 是采用实施例 4 的试剂及方法检测血液中网织红细胞所得前向散射光强度 - 荧光强度的散点图;

[0048] 图 5 是采用实施例 5 的试剂及方法检测血液中网织红细胞所得前向散射光强度 - 荧光强度的散点图;

[0049] 图 6 是采用实施例 6 的试剂及方法检测血液中网织红细胞所得前向散射光强度 - 荧光强度的散点图;

[0050] 图 7 是采用实施例 7 的试剂及方法检测血液中网织红细胞所得前向散射光强度 - 荧光强度的散点图。

具体实施方式

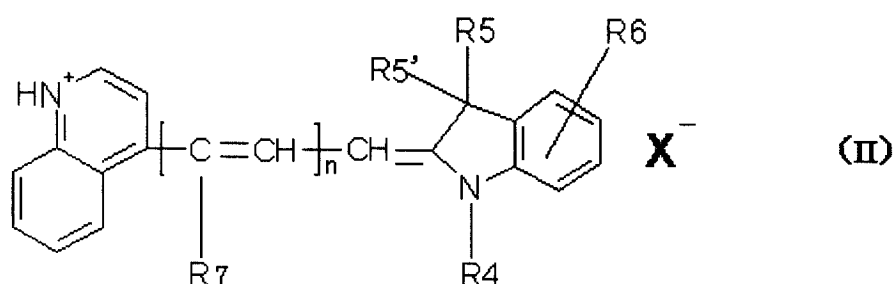
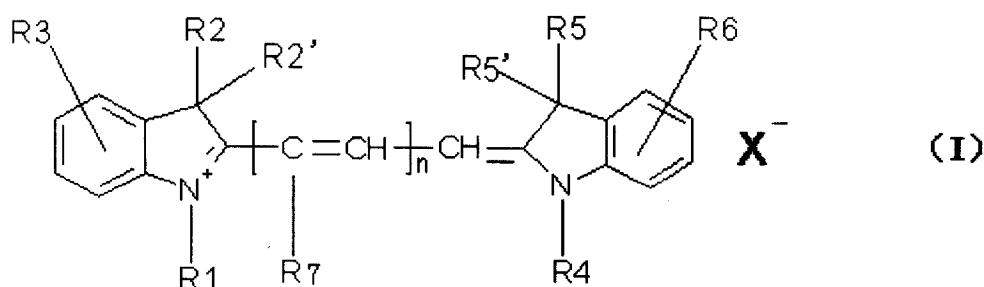
[0051] 血液中网织红细胞的检测在检验医学领域具有重要意义,手工镜检操作繁琐,不仅需要较长时间的染色孵育,不能有效的计算出网织红成熟指数,并且操作者间的个人辨别差异以及计数量少等因素,网织红细胞计数也产生较大的误差。本发明提供一种测定血液中网织红细胞的试剂,可以应用于基于流式技术的分析仪器,对血液中的网织红细胞快速标记。本发明的试剂主要含有两种功能试剂组分,一种为标记网织红细胞内残留 RNA 物质的荧光染料,另一种是能够快速使血液中红细胞系成为等体积球状的球形化试剂。本发明所采用的荧光染料能够被红色半导体激光器激发,这样标记了荧光染料的网织红细胞能够被廉价的半导体激光器所发激光激发,发射的荧光信号被收集分析后,能够准确计数血液样本中的网织红细胞。本发明试剂适用于血液细胞分析仪、网织红细胞分析仪、流式细胞分析仪。

[0052] 本发明采用一种新型红色激发的荧光染料,在一种试剂组合的作用下,使红细胞系等体积化,并对细胞内的 RNA 快速荧光标记,通过红色半导体激光器对标记了荧光的血

液细胞的照射,激发结合了细胞内 RNA 的荧光染料,通过对荧光强度的测量,反映网织红细胞的成熟指数,从而实现从大量的成熟红细胞中识别网织红细胞并进行有效计数,并计算网织红细胞的成熟指数的功能,满足临床检验领域对网织红细胞检测的需求。

[0053] 本发明网织红细胞检测试剂中,最关键成分为一种新型的红色激发荧光染料,为菁类阳离子荧光染料,能够被红色半导体激光器等提供红色区域激光的器件发出的红色激光所激发;该荧光染料能够特异结合细胞内核酸 (RNA、DNA),可以标记网织红细胞内残留的核酸物质。本发明的红色激发荧光染料具有如下式 (I) 或 (II) 所示的结构,

[0054]

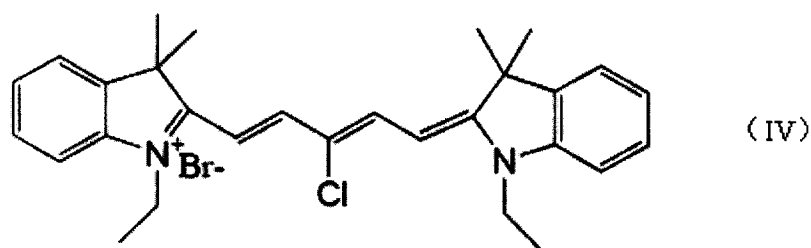
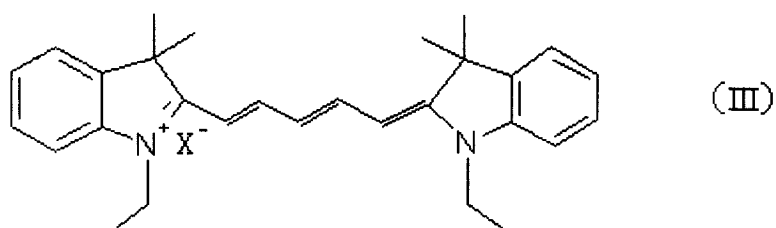


[0055] 其中, R1、R2、R2'、R3、R4、R5、R5'、R6 可以相同或不相同,表示氢原子、低级烷基、酰基、低级烷氧基或带苯环的低级烷基,其中 R6 还可以是苯环;R7 为氢原子或氯原子;n 为 1 或 2;X⁻ 为阴离子。

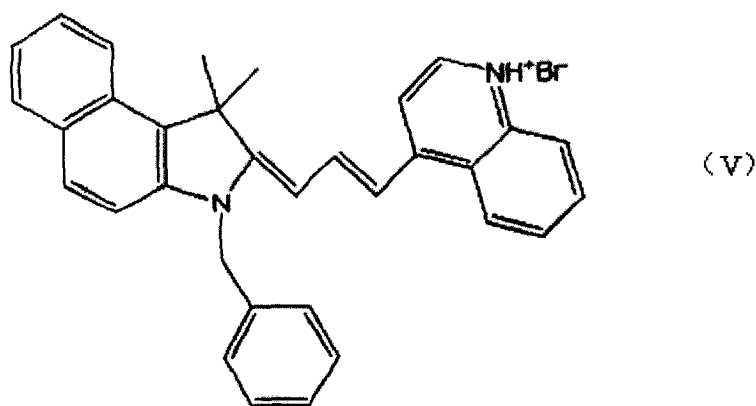
[0056] 本发明中,所述低级烷基通常是指具有 1~30 个碳原子数的烷基。

[0057] 本发明优选具有如下式 (III)、(IV) 或 (V) 所示的结构的红色激发荧光染料,

[0058]



[0059]



[0060] 本发明的网织红细胞检测试剂中,还有一种重要成分为球形化试剂,该球形化试剂能够消除由于红细胞形状带来的检测误差。本发明所用的球形化试剂以引起红细胞系、血小板系细胞等体积球化的有效剂量使用,通常的使用浓度范围为 5 ~ 2000mg/L。本发明中的球形化试剂一般为两性表面活性剂,如烷基甜菜碱类、磺基甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱。优选烷基甜菜碱,例如椰油酰胺甜菜碱(十二烷基二甲基甜菜碱)。

[0061] 本发明的网织红细胞检测试剂中可含有使 pH 保持一定的缓冲液。使用缓冲液使 pH 保持一定由此可稳定网织红细胞的染色效果,使用浓度在 0.01mM ~ 100mM 左右。缓冲液的种类,只要是通常使用的,并不特别限定,例如适当使用浓度的羧酸盐类、磷酸盐类、柠檬酸盐类、以及有机缓冲液等。本发明试剂组合中的合适 pH 因荧光染料的使用浓度不同而有所不同,一般在 pH5.0 ~ 11.0 范围,理想的 pH 是处于人血液正常生理 pH 范围,即 pH7 ~ 8 之间。若 pH 比上述范围过低,则红细胞容易脆化而溶血,使得测定网织红细胞的准确率下降。若 pH 过高,则红细胞容易与阳离子荧光染料结合,非特异性结合增加,而使得网织红细胞测定的假阳性增高。

[0062] 本发明的检测试剂中还可以含有荧光染料促染液,一般采用阳离子表面活性剂作为适当破坏细胞膜结构,促进荧光染料快速进入细胞与靶点结合。阳离子表面活性剂可以为溴化辛基三甲基铵(OTAB)、溴化癸基三甲基铵(DTAB)、氯化十二烷基三甲基铵(LTAC)、十四烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十四烷基三甲基氯化铵(CTAC)等,优选为 CTAC,使用浓度通常为 0.5 ~ 250mg/L。阳离子表面活性剂的作用机制虽然不清楚,但由于实验证实上述浓度范围内能够确切增加荧光染料进入细胞内部,促进荧光染料的通透性,但过多的阳离子表面活性剂将会伤害红细胞,引起溶血。

[0063] 本发明的网织红细胞检测试剂中,还可以含有渗透压调节剂。本发明试剂合适渗透压范围是 200mOsm/kg ~ 380mOsm/kg,渗透压在这个范围内变化时,对检测试剂的效果影响不大,但超过这个范围则系统误差增加。本发明的渗透压调节剂可以为一价或二价碱盐,且不会引起试剂组合物中的染料发生沉淀或者逆反应。本发明的渗透压调节剂也可以使用有机酸的碱金属盐、葡萄糖、甘露糖等糖类。

[0064] 本发明的检测试剂中还可以含有防腐剂,譬如可以使用体外诊断试剂常用的防腐剂,如 supelco 公司的 ProClin200,其可以有效地控制试剂中微生物的生长,使用浓度为 0.01% ~ 0.10%。也可使用 2-吡啶基硫代-1-氧化钠或 beta-苯乙醇等防腐剂。

[0065] 本发明所用的菁类阳离子荧光染料在水中溶解度不好,并且容易聚集,但可以溶解在乙醇、二甲亚砜、乙二醇中保存并作为储存液,也可以溶解在其它非水溶剂中,优选用

二甲亚砷做溶解剂。由于荧光染料容易聚集,本发明采用非离子表面活性剂作为分散液,使荧光染料保持一定的溶解度,不产生聚集颗粒。如聚氧乙烯乙二醇 (POE)、聚丙烯乙二醇 (POP)、聚氧乙烯乙二醇-聚丙烯乙二醇 (POE-POP)、Brij 系列非离子表面活性剂。优选 Brij35、Brij56 等为荧光染料的分散剂,使用浓度为 0.02%~2%。

[0066] 本发明还涉及一种网织红细胞检测方法。该方法中,通过将血液样本与本发明的网织红细胞检测试剂混合,含有网织红细胞的血液样本可以被含有荧光染料的试剂染色并使红细胞系成为等体积。血液样本可以是全血,也可以是成分血。血液样本与本发明检测试剂的总体积应保证足够的细胞浓度通过仪器的测量池。本发明的方法中,网织红细胞检测试剂与血液样本的混合比例为 250 : 1 ~ 1000 : 1,优选为 500 : 1。混合后在孵育池中进行孵育。孵育温度优选 25 ~ 50℃,更优选 35℃。反应时间将因试剂中含有的色素不同,以及浓度的不同而有差异,优选 10 秒-1 分钟,更优选 20 秒~40 秒,最优选 30 秒。

[0067] 随后稀释并染色的血液导入具有红色波长光源的血液分析仪或类似的流式细胞仪的检测通道进行检测。本发明采用红色半导体激光器发射的红色区域激光为检测的光源,所使用红色波长的光源,能够发出所用色素的激发波长附近的红色波长的光,例如 600 ~ 680nm 左右的光,则没有特殊的限制,例如可以使用 He-Ne 激光器、红色区域的半导体激光器等。荧光强度反应血液样本中靶点荧光染料量。

[0068] 在检测仪器中,本发明中的荧光染料受到红色区域激光的激发将发出强烈的红色荧光,最大激发值约在 646nm 处,最大发射值约在 663nm,产生约 20nm 的斯托克斯 (Stokes) 位移。光源可以是红色二极管激光器、He-Ne 激光器等能够发射红色区域激光的激光器。

[0069] 用上述红色波长光源在鞘流中流动的细胞上照射红色波长的光,测定由细胞发出的散射光及荧光。此时的散射光可以是前向散射光 (6 ~ 20°) 也可以是前方低角度散射光 (1 ~ 5°)。此时,散射光成为反映细胞大小信息的参数。

[0070] 利用散射光强度或散射光强度与荧光强度辨别血小板与红细胞系细胞、网织红细胞及白细胞;将各细胞分类计数,算出细胞数及细胞比率。

[0071] 下面通过具体的实施例对本发明作进一步详细的描述。

[0072] 实施例 1 :

[0073] 配置如下组成的网织红细胞检测试剂。

[0074]	荧光染料 (III)	7mg
[0075]	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	53.8mg
[0076]	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	163.4mg
[0077]	椰油酰胺丙基甜菜碱	100mg
[0078]	精致水	1L

[0079] (调整 pH 为 7)

[0080] 在 1 毫升的试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 4 微升,在 40℃ 下恒温放置 30 秒后,或在孵育池中孵育 30 秒,形成测定用试样。测定用试样采用带红色半导体激光器的检测仪器进行检测,激发波长为 633nm ~ 635nm,功率为 5mW。通过测定前方低角度散射光强及荧光强度,得到如图 1 所示的散射图,其中网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 1.25%。

[0081] 另外,将相同血样采用传统手工镜检方法检测,结果网织红细胞 (RET) 在总红细

胞中所占的比例为 1.17%。

[0082] 采用上述网织红细胞检测试剂处理后经仪器检测的结果与手工镜检结果一致性好。

[0083] 实施例 2：

[0084] 配置如下组成的网织红细胞检测试剂。

[0085]	荧光染料 (III)	7mg
[0086]	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	53.8mg
[0087]	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	163.4mg
[0088]	椰油酰胺丙基甜菜碱	100mg
[0089]	精致水	1L

[0090] (调整 pH 为 7)

[0091] 在 1 毫升试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 4 微升,在 40℃下恒温放置 30 秒后,或孵育池中孵育 30 秒,形成测试用试样。测定用试样采用带红色半导体激光器的检测仪器进行检测,激发波长为 633nm ~ 635nm,功率为 5mW。通过测定前方低角度散射光强度及荧光强度,得到如图 2 所示的散射图。其中网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 5.08%。

[0092] 另外,将相同血样采用传统手工镜检方法检测,结果网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 5.22%。

[0093] 采用上述网织红细胞检测试剂处理后经仪器检测的结果与手工镜检结果一致性好。

[0094] 本实施例与实施例 1 不同之处在于所测定血液样本不同,实施例 1 所测为正常人血液样本,本实施例所测异常血液样本,含有较高的网织红细胞。

[0095] 实施例 3：

[0096] 配制如下组成的网织红细胞测定用试剂。

[0097]	荧光染料 (IV)	7mg
[0098]	磷酸氢二钠	53.8mg
[0099]	磷酸二氢钠	163.4mg
[0100]	椰油酰胺丙基甜菜碱	100mg
[0101]	精致水	1L

[0102] (调整 pH 为 7)

[0103] 在 1 毫升试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 4 微升,在 40℃下恒温放置 30 秒后,或孵育池中孵育 30 秒,形成测试用试样。测定用试样采用带红色半导体激光器的检测仪器进行检测,激发波长为 633nm ~ 635nm,功率为 5mW。通过测定前方低角度散射光强度及荧光强度,得到如图 3 所示的散射图。其中网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 5.35%。

[0104] 另外,将相同血样采用传统手工镜检方法检测,结果网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 5.22%。

[0105] 采用上述网织红细胞检测试剂处理后经仪器检测的结果与手工镜检结果一致性好。

[0106] 本样本为异常血液,网织红细胞含量较高,实施例采用荧光染料 IV 进行标记。

[0107] 实施例 4:

[0108] 配制如下组成的网织红细胞测定用试剂。

[0109]	荧光染料 (V)	7mg
[0110]	磷酸氢二钠	53.8mg
[0111]	磷酸二氢钠	163.4mg
[0112]	椰油酰胺丙基甜菜碱	100mg
[0113]	精致水	1L

[0114] (调整 pH 为 7)

[0115] 在 1 毫升试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 4 微升,在 40℃ 下恒温放置 30 秒后,或孵育池中孵育 30 秒,形成测试用试样。测定用试样采用带红色半导体激光器的检测仪器进行检测,激发波长为 633nm ~ 635nm,功率为 5mW。通过测定前方低角度散射光强度及荧光强度,得到如图 4 所示的散射图。其中网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 5.35%。

[0116] 另外,将相同血样采用传统手工镜检方法检测,结果网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 5.22%。

[0117] 采用上述网织红细胞检测试剂处理后经仪器检测的结果与手工镜检结果一致性好。

[0118] 本样本为异常血液,网织红细胞含量较高,本实施例采用荧光染料 V 进行标记。

[0119] 实施例 5:添加阳离子促染剂后的测试结果。

[0120] 配制如下组成的网织红细胞测定用试剂。

[0121]	荧光染料 (III)	7mg
[0122]	磷酸氢二钠	3.8mg
[0123]	磷酸二氢钠	163.4mg
[0124]	椰油酰胺丙基甜菜碱	100mg
[0125]	十四烷基三甲基氯化铵	1mg
[0126]	精致水	1L

[0127] (调整 pH 为 7)

[0128] 在 1 毫升试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 4 微升,在 40℃ 下恒温放置 30 秒后,或孵育池中孵育 30 秒,形成测试用试样。测定用试样采用带红色半导体激光器的检测仪器进行检测,激发波长为 633nm ~ 635nm,功率为 5mW。通过测定前方低角度散射光强度及荧光强度,得到如图 5 所示的散射图。其中网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 1.66%。

[0129] 另外,将相同血样采用传统手工镜检方法检测,结果网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 1.45%

[0130] 采用上述网织红细胞检测试剂处理后经仪器检测的结果与手工镜检结果一致性好。

[0131] 本实施例与实施例 1 不同,在于采用阳离子表面活性剂促进荧光染料进入细胞内。

[0132] 实施例 6：

[0133] 配制如下组成的网织红细胞测定用试剂。

[0134]	荧光染料 (V)	7mg
[0135]	磷酸氢二钠	53.8mg
[0136]	磷酸二氢钠	163.4mg
[0137]	椰油酰胺丙基甜菜碱	100mg
[0138]	十四烷基三甲基氯化铵	1mg
[0139]	精致水	1L

[0140] (调整 pH 为 7)

[0141] 在 1 毫升试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 4 微升,在 40℃下恒温放置 30 秒后,或孵育池中孵育 30 秒,形成测试用试样。测定用试样采用带红色半导体激光器的检测仪器进行检测,激发波长为 633nm ~ 635nm,功率为 5mW。通过测定前方低角度散射光强度及荧光强度,得到如图 6 所示的散射图。其中网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 1.80%。

[0142] 另外,将相同血样采用传统手工镜检方法检测,结果网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 1.66%

[0143] 采用上述网织红细胞检测试剂处理后经仪器检测的结果与手工镜检结果一致性好。

[0144] 本实施例与实施例 4 不同之处在于所测定为正常血液样本,而且试剂中添加了阳离子促染分子。

[0145] 实施例 7：

[0146] 配制如下组成的网织红细胞测定用试剂。

[0147]	荧光染料 (V)	7mg
[0148]	磷酸氢二钠	53.8mg
[0149]	磷酸二氢钠	163.4mg
[0150]	椰油酰胺丙基甜菜碱	100mg
[0151]	十四烷基三甲基氯化铵	1mg
[0152]	精致水	1L

[0153] (用 HCl 调整 pH 为 5)

[0154] 在 1 毫升试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 4 微升,在 40℃下恒温放置 30 秒后,或孵育池中孵育 30 秒,形成测试用试样。测定用试样采用带红色半导体激光器的检测仪器进行检测,激发波长为 633nm ~ 635nm,功率为 5mW。通过测定前方低角度散射光强度及荧光强度,得到如图 7 所示的散射图。其中网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 5.55%。

[0155] 另外,将相同血样采用传统手工镜检方法检测,结果网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 5.22%

[0156] 采用上述网织红细胞检测试剂处理后经仪器检测的结果与手工镜检结果一致性好。

[0157] 本实施例与实施例 6 不同之处是测定异常血液样本,网织红细胞含量较高。

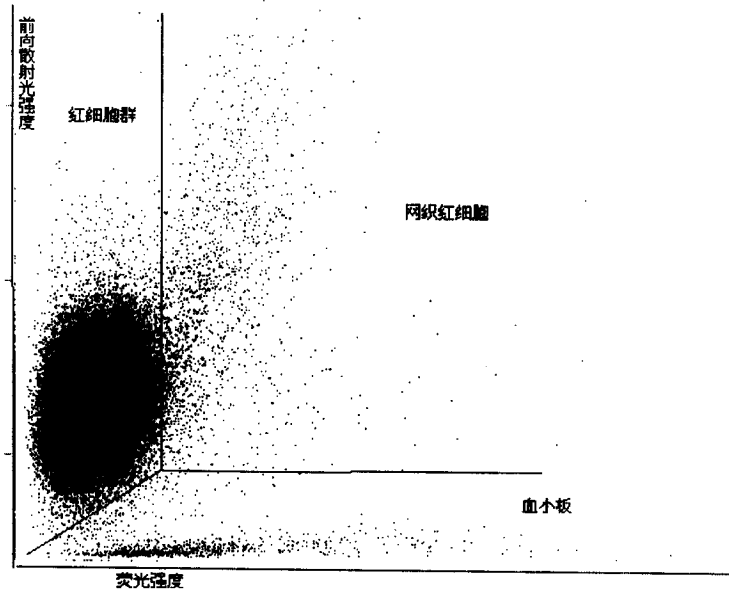


图 1

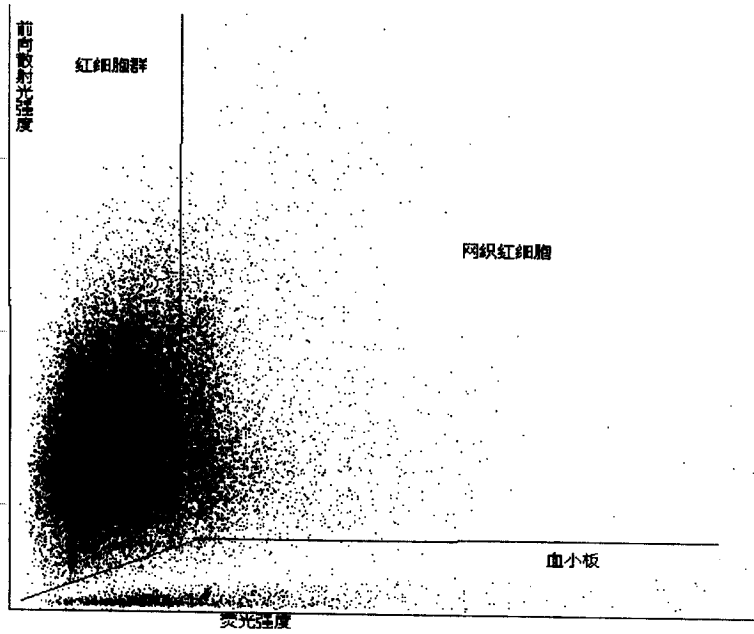


图 2

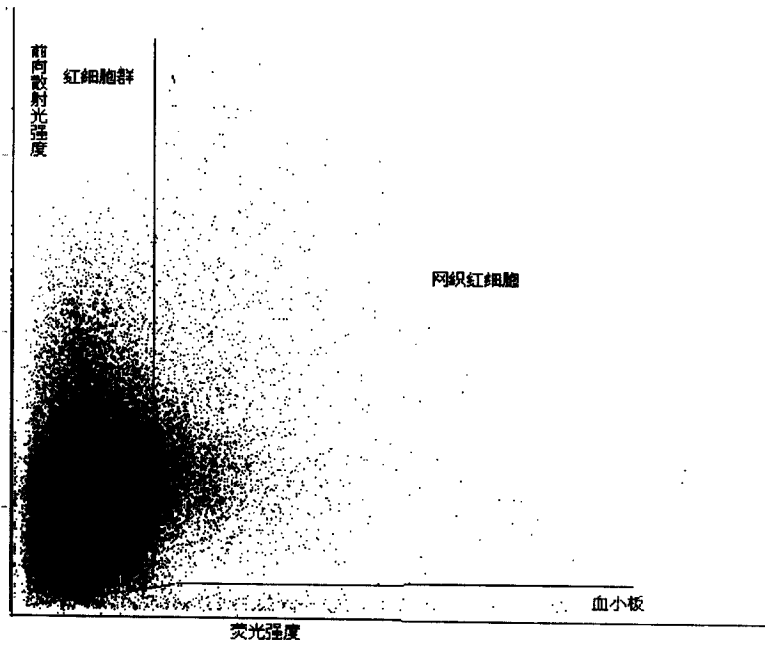


图 3

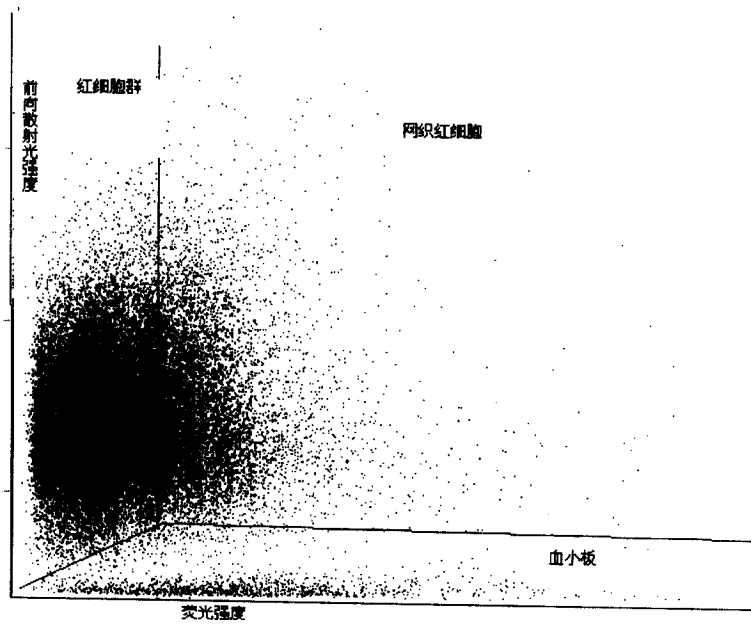


图 4

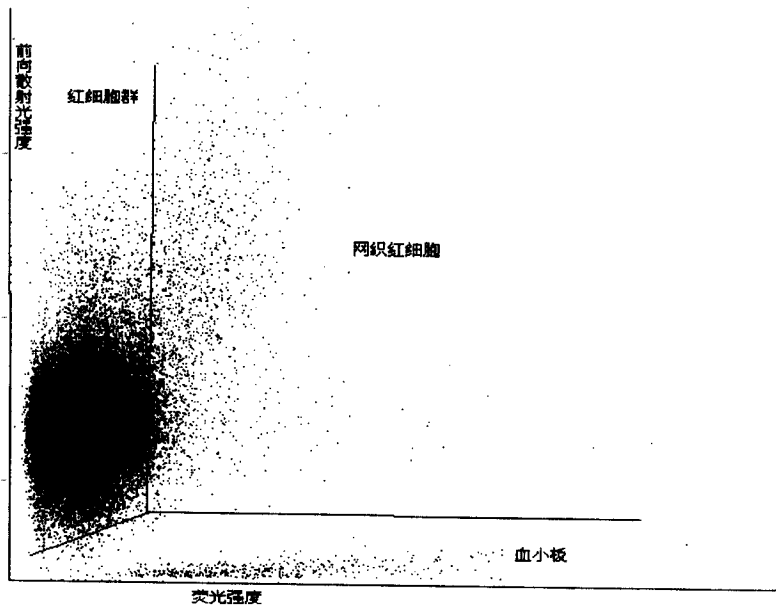


图 5

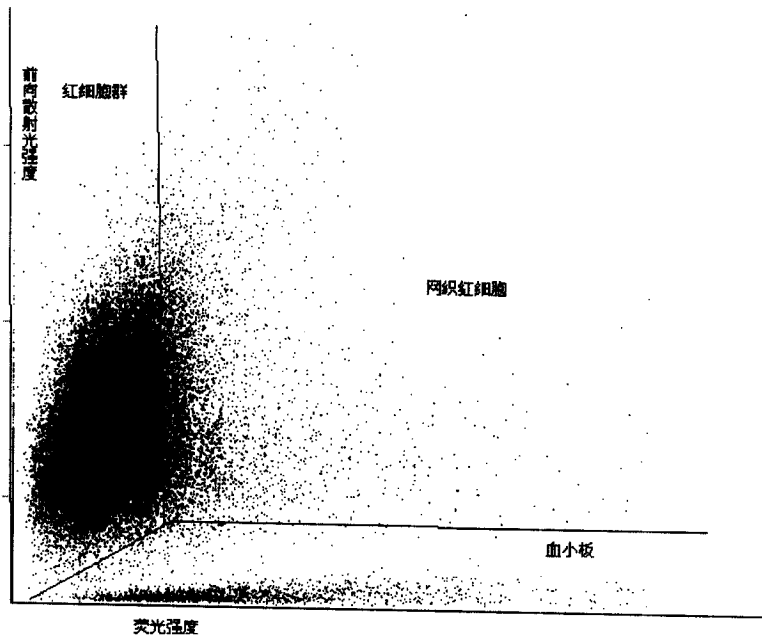


图 6

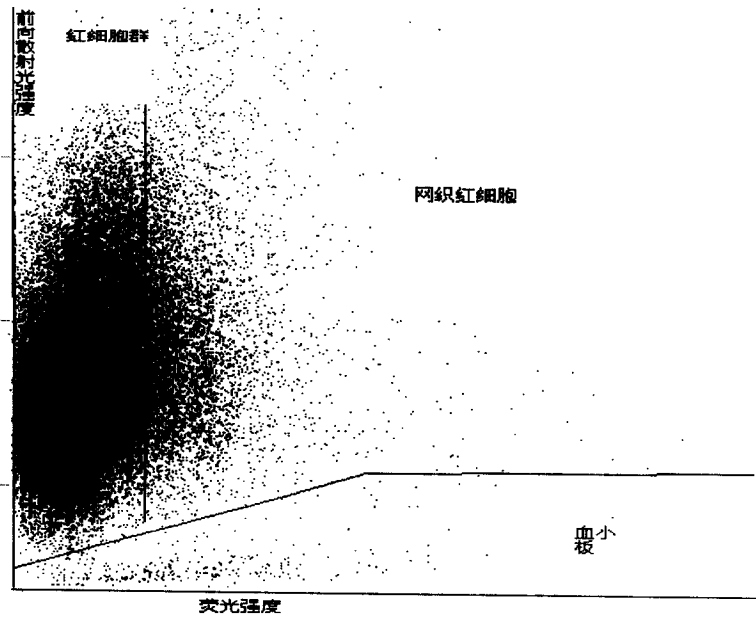


图 7