

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 5 月 19 日 (19.05.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/100717 A1

(51) 国际专利分类号:
C09B 23/10 (2006.01) **C07D 513/04** (2006.01)
C07D 417/06 (2006.01)

ELECTRONICS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省
深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二
路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/130478

(22) 国际申请日: 2021 年 11 月 12 日 (12.11.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

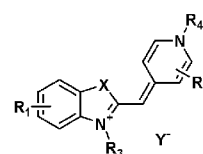
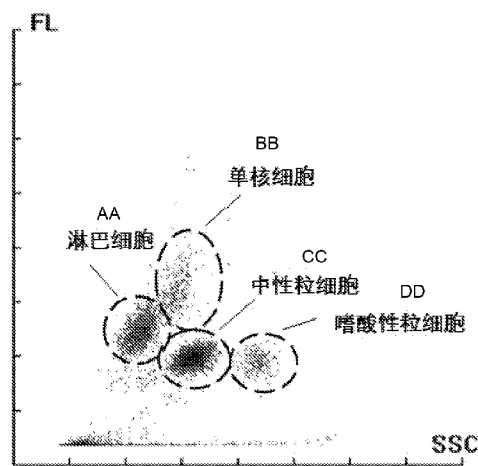
(30) 优先权:
PCT/CN2020/128839
2020 年 11 月 13 日 (13.11.2020) CN

(71) 申请人: 大连理工大学 (**DALIAN UNIVERSITY
OF TECHNOLOGY**) [CN/CN]; 中国辽宁省大
连市甘井子区凌工路 2 号, Liaoning 116024
(CN)。 深圳迈瑞生物医疗电子股份
有限公司 (**SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL**

(72) 发明人: 樊江莉 (**FAN, Jiangli**); 中国辽宁省大连
市甘井子区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。
陈庚文 (**CHEN, Gengwen**); 中国广东省深圳市
南山区高新技术产业园区科技南十二路迈
瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。 夏天平 (**XIA,
Tianping**); 中国辽宁省大连市甘井子区凌工
路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。 叶燊 (**YE, Yi**); 中
国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, Guangdong 518057
(CN)。 张子千 (**ZHANG, Ziqian**); 中国广东省
深圳市南山区高新技术产业园区科技南十
二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。 姚起

(54) **Title:** LEUKOCYTE CLASSIFICATION REAGENT, ERYTHROCYTE ANALYSIS REAGENT, KITS, AND ANALYSIS METHOD

(54) 发明名称: 白细胞分类试剂、红细胞分析试剂、试剂盒以及分析方法



EE 式 F

AA Lymphocytes
BB Monocytes
CC Neutrophils
DD Eosinophils
EE Formula F

图 1

(57) **Abstract:** Disclosed are a leukocyte classification reagent and kit, a classification method, an erythrocyte analysis reagent and kit, and an analysis method. Both the leukocyte classification reagent and the erythrocyte analysis reagent comprise a fluorescent dye having the general formula F. The dye can color the nucleic acids of leukocytes and erythrocytes, therefore, during blood analysis, the classification and/or counting of the leukocytes in a sample can be accurately realized, and the classification and/or counting of the erythrocytes in a sample can be accurately realized, in particular the identification and/or counting of RETs. In addition, the types of dyes used in blood cell analysis may also be simplified.

(57) **摘要:** 一种白细胞分类试剂、试剂盒及分类方法, 红细胞分析试剂、试剂盒、及分析方法。白细胞分类试剂和红细胞分析试剂均包含具有通式 F 的荧光染料。该染料可以对白细胞和红细胞的核酸染色, 故在血液分析时, 能准确实现对样本中白细胞的分类和/或计数, 以及准确实现对样本红细胞的分类和/或计数, 尤其是对 RET 的识别和/或计数。此外, 还可简化血细胞分析时所用的染料种类。

超(YAO, Qichao); 中国辽宁省大连市甘井子区
凌工路2号, Liaoning 116024 (CN)。

(74) 代理人: 北京磐华捷成知识产权代理有限公司(P.
C. & ASSOCIATES); 中国北京市朝阳区建国门外
大街22号赛特大厦9层, Beijing 100022 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

白细胞分类试剂、红细胞分析试剂、试剂盒以及分析方法

5

技术领域

本发明涉及红白细胞分析试剂和其使用方法，具体涉及通过分析仪自动区分血液中白细胞各亚群的试剂、识别血液中红细胞及种类的试剂、和方法。

10

背景技术

血细胞分为红细胞（Red Blood Cell，RBC）、白细胞（White Blood Cell，WBC）、血小板（Platelet，PLT）等三类细胞，血常规检查时经常需要检测白细胞分类及数量、红细胞数量和血小板数量。

正常外周血中的白细胞通常可分为五类，即淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。由血液样本分析白细胞群体可为众多疾病的临床诊断提供许多有用的信息。例如，在出现疾病时血液中的各类白细胞的比例和数量可能发生变化，同时还可能出现异常淋巴细胞和幼稚粒细胞等异常白细胞。因此，分类并测定不同类型的正常和异常白细胞可获得有关疾病潜伏、起始和发展阶段等方面的信息。

正常外周血中的红细胞包括成熟红细胞和少量网织红细胞(reticulocyte，RET)。网织红细胞(reticulocyte，RET)是介于晚幼红细胞和成熟红细胞之间的过渡阶段细胞，略大于成熟红细胞。网织红细胞是有核红细胞刚刚失去核的阶段，仍属未完全成熟的红细胞，其胞质中尚有核糖体、核糖核酸等嗜碱性物质残存，经煌焦油蓝或新亚甲蓝活体染包后，胞质中可见蓝或蓝绿色枝点状甚至网织状结构，故名网织红细胞。目前的研究认为，网织红细胞作为红细胞成熟过程中的一个重要阶段也应被重视。

现有分析仪的荧光分析方法，都是通过不同的染料来实现对红白细胞的分析，对于仪器和液路设计比较复杂。因此，需要一种新染料可分别用于红细胞和白细胞的分类和计数，来简化血液分析仪的结构。

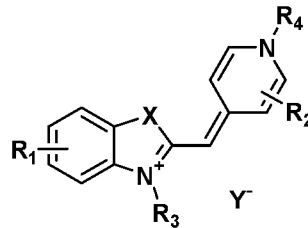
30

发明内容

在发明内容部分中引入了一系列简化形式的概念，这将在具体实施方

式部分中进一步详细说明。本发明的发明内容部分并不意味着要试图限定出所要求保护的技术方案的关键特征和必要技术特征，更不意味着试图确定所要求保护的技术方案的保护范围。

为至少部分地解决上述问题，本申请的第一方面提供了一种白细胞分类试剂，所述试剂包含具有式 F 的荧光染料：



式 F

其中，X 选自由 C(CH₃)₂、O、S 和 Se 组成的组；

R₁ 和 R₂ 各自独立地选自由 H、C₁-C₁₈ 烷基、苯基、OR₆ 和卤素组成的组；

R₃ 和 R₄ 各自独立地选自由 C₁-C₁₈ 烷基、C₁-C₁₈ 羧基、C₁-C₁₈ 羟基、C₁-C₁₈NR₅R₆、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C₁-C₁₈ 烷基、CN、COOH、NH₂、NO₂、OH、SH、C₁-C₆ 烷氧基、C₁-C₆ 烷基氨基、C₁-C₆ 酰氨基、卤素和 C₁-C₆ 卤代烷基组成的组；

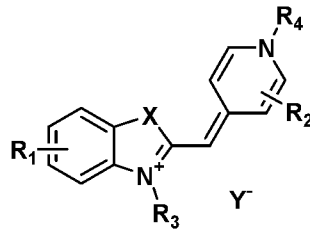
R₅ 和 R₆ 各自独立地选自由 H 和 C₁-C₁₈ 烷基组成的组；

Y⁻ 为负离子。

本申请中具有式 F 的荧光染料，属于菁类化合物，具有良好的活细胞通透性，能够在不破坏细胞膜的情况进入细胞对核酸进行染色，用于血液分析中，对白细胞进行染色，实现对白细胞的分类和/或计数。一个实施例中，所述染料的激发光为波长较小的蓝绿色光，能够识别微小颗粒，提高了对小粒子的检测能力。

本申请的第二方面提供一种白细胞分析试剂盒，其包括上述第一方面所述的白细胞分类试剂。本申请的白细胞分析试剂盒，在血液分析中可对白细胞进行分类和/或计数；将白细胞分类为淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、和嗜酸性粒细胞，并可对分类后的细胞进行计数。

本申请的第三方面提供一种白细胞分类方法，所述方法包括：将血液样品、具有式 F 的荧光染料、和红细胞溶解剂混合形成混合物；其中，式 F 为



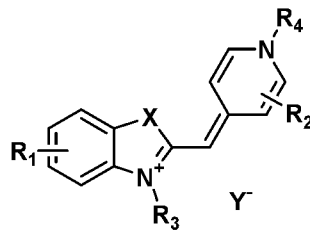
其中，X、R₁、R₂、R₃、R₄和Y⁻如上述第一方面在所述白细胞分类试剂中所定义；

用光照射所述待测试样中的粒子，测定所述待测试样的至少一种散射光

5 特性和至少一种荧光特性；

根据所述散射光特性和荧光特性对白细胞进行分类和/或计数。

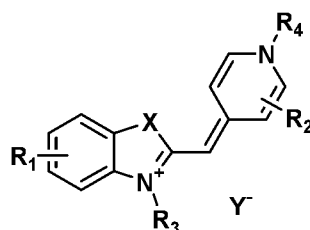
本申请的第四方面提供一种红细胞分析试剂，所述试剂包含具有式F的荧光染料；其中，式F为



10 其中，X、R₁、R₂、R₃、R₄和Y⁻如上述第一方面在所述白细胞分类试剂中所定义。红细胞分析试剂用于血液分析中，可以对红细胞进行染色，获得红细胞的参数。

本申请的第五方面提供一种红细胞分析试剂盒，所述试剂盒包含如第四方面所述的红细胞分析试剂。本申请的白细胞分析试剂盒，在血液分析
15 中可对红细胞进行分类和/或计数；红细胞分类包括：将红细胞区分为成熟红细胞和/或网织红细胞；所述红细胞计数包括：对成熟红细胞和/或网织红细胞的计数。

本申请的第六方面提供一种红细胞分析方法，包括：将血液样品、具有式F的荧光染料、和球形化试剂混合形成混合物；其中，式F为



其中，X、R₁、R₂、R₃、R₄和Y如上述第一方面在白细胞分类试剂中所定义；

测定所述混合物的至少一种散射光特性和至少一种荧光特性；

根据所述散射光特性和荧光特性获得红细胞分类和/或计数。

- 5 本申请中的白细胞分类试剂和红细胞分析试剂均包含有具有式F的荧光染料，该染料可以对白细胞和红细胞的核酸染色，故在血液分析时，能准确实现对样本中白细胞的分类和/或计数，以及准确实现对样本红细胞的分类和/或计数，尤其是对RET的识别和/或计数。此外，还可简化血细胞分析时所用染料种类。

10

附图说明

本发明的下列附图在此作为本发明的一部分用于理解本发明。附图中示出了本发明的实施例及其描述，用来解释本发明的原理。

附图中：

- 15 图1示出了采用具有化学式I的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图2示出了采用具有化学式I的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

- 20 图3示出了采用具有化学式II的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图4示出了采用具有化学式II的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

图5示出了采用具有化学式III的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

- 25 图6示出了采用具有化学式III的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

图7示出了采用具有化学式IV的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

- 30 图8示出了采用具有化学式IV的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

图 9 示出了采用具有化学式 V 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图 10 示出了采用具有化学式 V 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

5 图 11 示出了采用具有化学式 VI 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图 12 示出了采用具有化学式 VI 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

10 图 13 示出了采用具有化学式 VII 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图 14 示出了采用具有化学式 VII 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

图 15 示出了采用具有化学式 VIII 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

15 图 16 示出了采用具有化学式 VIII 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

图 17 示出了采用具有化学式 IX 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

20 图 18 示出了采用具有化学式 IX 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

图 19 示出了采用具有化学式 X 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图 20 示出了采用具有化学式 X 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

25 图 21 示出了采用具有化学式 XI 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图 22 示出了采用具有化学式 XI 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

30 图 23 示出了采用具有化学式 XII 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图 24 示出了采用具有化学式 XII 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图；

图 25 示出了采用具有化学式 XIII 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图 26 示出了采用具有化学式 XIII 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图

5 图 27 示出了采用具有化学式 XVIII 的化合物作为荧光染料用于分类白细胞的侧向散射光-荧光散点图；

图 28 示出了采用具有化学式 XVIII 的化合物作为荧光染料用于检测红细胞和血小板的荧光-前向散射光散点图

10 具体实施方式

在下文的描述中，给出了大量具体的细节以便提供对本发明更为彻底的理解。然而，对于本领域技术人员而言显而易见的是，本发明可以无需一个或多个这些细节而得以实施。在其他的例子中，为了避免与本发明发生混淆，对于本领域公知的一些技术特征未进行描述。

15 为了彻底理解本发明，将在下列的描述中提出详细的描述。显然，本发明实施方式的施行并不限于本领域的技术人员所熟悉的特殊细节。本发明的较佳实施例详细描述如下，然而除了这些详细描述外，本发明还可以具有其他实施方式。

20 应予以注意的是，这里所使用的术语仅是为了描述具体实施例，而非意图限制根据本发明的示例性实施例。如在这里所使用的，除非上下文另外明确指出，否则单数形式也意图包括复数形式。此外，还应当理解的是，当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时，其指明存在所述特征、整体、步骤、操作、元件和/或组分，但不排除存在或附加一个或多个其他特征、整体、步骤、操作、元件、组分和/或它们的组合。

25 除另有说明外，本文中使用的术语“血液”或“血液样品”是指包含血细胞的体液样品，例如外周血、骨髓液等。

特别地，如本申请自始至终所使用的，术语烷基可以在最广义上理解为任何线性、支化或环状的烷基取代基。如本文使用的术语“C₁₋₁₈ 烷基”一般指在构型中具有 1 至 18 个碳原子的饱和烃基团，C₁₋₁₈ 烷基包括但不限于 C₁₋₁₂ 烷基、C₁₋₆ 烷基等。在未描述为“取代烷基”的情况下，术语“烷基”通常指未取代的烷基。示例性地，术语烷基包括取代基甲基 (Me)，乙基 (Et)，正丙基 (nPr)，异丙基 (iPr)，环丙基，正丁基 (nBu)，异丁

基 (iBu), 仲丁基 (sBu), 叔丁基 (tBu), 环丁基, 2-甲基丁基, 正戊基, 仲戊基, 叔戊基, 2-戊基, 新戊基, 环戊基, 正己基, 仲己基, 叔己基, 2-己基, 3-己基, 新己基, 环己基, 1-甲基环戊基, 2-甲基戊基, 正庚基, 2-庚基, 3-庚基, 4-庚基, 环庚基, 1-甲基环己基, 正辛基, 2-乙基己基, 5 环辛基, 1-双环[2,2,2]辛基, 2-双环[2,2,2]-辛基, 2-(2,6-二甲基)辛基, 3-(3,7-二甲基)辛基, 金刚烷基, 2,2,2-三氟乙基, 1,1-二甲基-正己-1-基, 1,1-二甲基-正庚-1-基, 1,1-二甲基-正辛-1-基, 1,1-二甲基-正癸-1-基, 1,1-二甲基-正十二烷-1-基, 1,1-二甲基-正十四烷-1-基, 1,1-二甲基-正十六烷-1-基, 1,1-二甲基-正十八烷-1-基, 1,1-二乙基-正己-1-基, 1,1-二乙基-正庚-1-基, 1,1-二乙基-正辛-1-基, 1,1-二乙基-正癸-1-基, 1,1-二乙基-正十二烷-1-基, 1,1-二乙基-正十四烷-1-基, 1,1-二乙基-正十六烷-1-基, 1,1-二乙基-正十八烷-1-基, 10 1-(正丙基)-环己-1-基, 1-(正丁基)-环己-1-基, 1-(正己基)-环己-1-基, 1-(正辛基)-环己-1-基和 1-(正癸基)-环己-1-基等。

如上文和此处所使用的, 术语羧基包括任何线性、支化或环状的羧基取代基。如本文使用的术语 C_{1-18} 羧基一般指在构型中具有 1 至 18 个碳原子的羧基取代基团, C_{1-18} 羧基包括但不限于 C_{1-12} 羧基、 C_{1-6} 羧基等。特别的, 术语羧基指与如前文定义的烷基连接的具有羧基的基团。术语羧基示例性地包括甲羧基, 乙羧基, 丙羧基, 丁羧基, 戊羧基、己羧基、庚羧基和辛羧基, 以及它们的同分异构体等。

如上文和此处所使用的, 术语羟基包括任何线性、支化或环状的羟基取代基。如本文使用的术语 C_{1-18} 羟基一般指在构型中具有 1 至 18 个碳原子的羟基取代基团, C_{1-18} 羟基包括但不限于 C_{1-12} 羟基、 C_{1-6} 羟基等。特别的, 术语羟基指与如前文定义的烷基连接的具有羟基的基团。术语羟基示例性地包括羟甲基, 羟乙基, 羟丙基, 羟丁基, 羟戊基、羟己基、羟庚基和羟辛基, 以及它们的同分异构体等。

如上文和此处所使用的, 术语烷氧基包括任何线性、支化或环状的烷氧基取代基。特别的, 术语烷氧基指与如前文定义的烷基连接的烷氧基基团。术语烷氧基示例性地包括甲氧基, 乙氧基, 正丙氧基, 异丙氧基, 正丁氧基, 异丁氧基, 仲丁氧基, 叔丁氧基和 2-甲基丁氧基等。

如上文和此处所使用的, 术语“卤素”和“卤代”可以在最广泛的意义上理解为优选氟、氯、溴或碘。

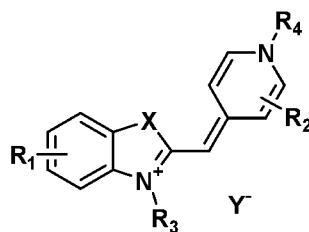
如本文所使用的, 如果在特定的上下文中没有更具体地定义, 蓝绿色

光波长约在 400-560 nm 的范围。

荧光染料

本申请的荧光染料属于菁类化合物，具有良好的活细胞通透性，能够
5 在不破坏细胞膜的情况进入细胞对核酸（RNA、DNA）进行特异性染色。
所述染料为蓝绿光激发荧光染料，能够被蓝色或绿色半导体激光器等提供蓝色或绿色区域激光的器件发出的蓝色或绿色激光所激发，这样本发明试剂可用于采用半导体激光器等廉价设备作为光源的血液分析仪或流式细胞仪等。

在一个实施例中，荧光染料具有式 F 所示的结构：



通式 F

其中，X 选自由 C(CH₃)₂、O、S 和 Se 组成的组；

R₁ 和 R₂ 各自独立地选自由 H、C₁-C₁₈ 烷基、苯基、OR₆ 和卤素组成的组；

15 R₃ 和 R₄ 各自独立地选自由 C₁-C₁₈ 烷基、C₁-C₁₈ 羧基、C₁-C₁₈ 羟基、C₁-C₁₈NR₅R₆、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C₁-C₁₈ 烷基、CN、COOH、NH₂、NO₂、OH、SH、C₁-C₆ 烷氧基、C₁-C₆ 烷基氨基、C₁-C₆ 酰氨基、卤素和 C₁-C₆ 卤代烷基组成的组；

R₅ 和 R₆ 各自独立地选自由 H 和 C₁-C₁₈ 烷基组成的组；

20 Y 为负离子。

一个实施例中，式 F 中的 X 选自由 C(CH₃)₂ 和 S 组成的组。

一个实施例中，式 F 中的 R₁ 和所述 R₂ 各自独立地选自由 H、C₁-C₁₂ 烷基、苯基、OR₆ 和卤素组成的组。

25 一个实施例中，式 F 中的 R₁ 和所述 R₂ 各自独立地选自由 H、C₁-C₆ 烷基、苯基、OR₆ 和卤素组成的组。

一个实施例中，式 F 中的 R₁ 选自由 H、C₁-C₆ 烷基、苯基和卤素组成的组。

一个实施例中，式 F 中的 R₂ 为 H。

一个实施例中，式 F 中的 R₃ 和 R₄ 各自独立地选自由 C₁-C₁₂ 烷基、C₁-C₁₂

羧基、 C_1-C_{12} 羟基、 $C_1-C_{12}NR_5R_6$ 、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C_1-C_{12} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 烷基氨基、 C_1-C_6 酰氨基、卤素和 C_1-C_6 卤代烷基组成的组。

- 5 一个实施例中，式F中的 R_3 和 R_4 各自独立地选自由 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 羧基、 C_1-C_6 羟基、 $C_1-C_6NR_5R_6$ 、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C_1-C_6 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 烷基氨基、 C_1-C_6 酰氨基、卤素和 C_1-C_6 卤代烷基组成的组。

- 10 一个实施例中，式F中的 R_3 选自由 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 羟基、 C_1-C_6 羧基、 $C_1-C_6NR_5R_6$ 和苄基组成的组。

一个实施例中，式F中的 R_4 选自由 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 羟基、 C_1-C_6 羧基、和苄基组成的组。

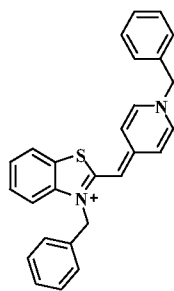
一个实施例中，式F中的 R_5 和 R_6 各自独立地选自由H和 C_1-C_{12} 烷基组成的组。

- 15 一个实施例中，式F中的 R_5 和 R_6 各自独立地选自由H和 C_1-C_6 烷基组成的组。

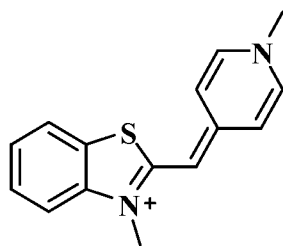
一个实施例中，式F中的 R_5 和 R_6 各自独立地为 C_1-C_6 烷基。

一个实施例中，式F中的Y选自由卤素负离子、 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 、 CH_3COO^- 或 OTs^- 组成的组。

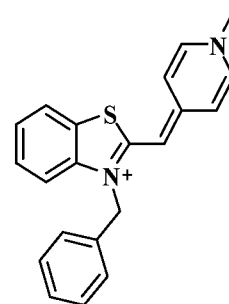
- 20 一个实施例中，荧光染料包含化学式I、化学式II、化学式III、化学式IV、化学式V、化学式VI、化学式VII、化学式VIII、化学式IX、化学式X、化学式XI、化学式XII、化学式XIII、化学式XIV、化学式XV、化学式XVI、化学式XVII和化学式XVIII的结构，



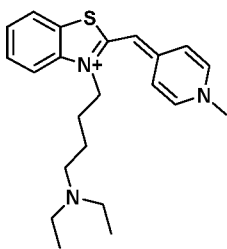
化学式 I



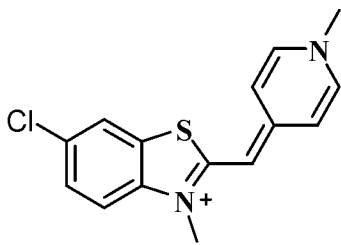
化学式 II



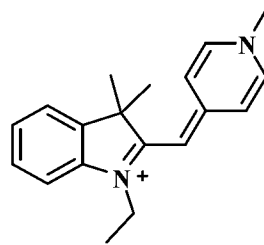
化学式 III



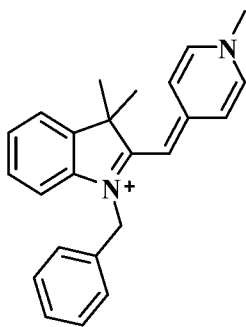
化学式 IV



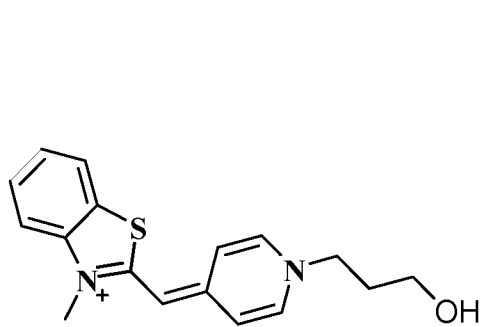
化学式 V



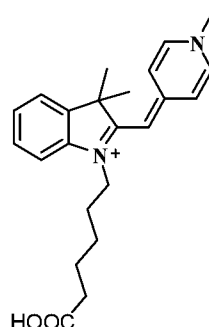
化学式 VI



化学式 VII

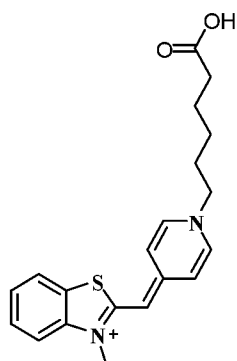


化学式 VIII

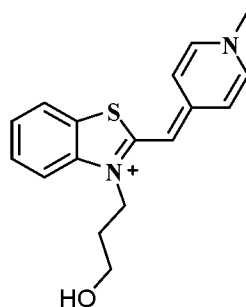


化学式 IX

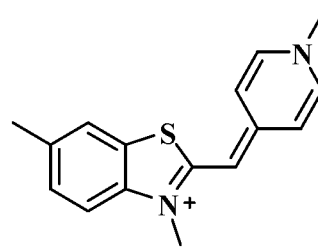
5



化学式 X

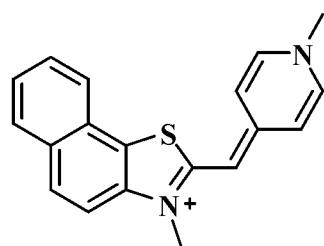


化学式 XI

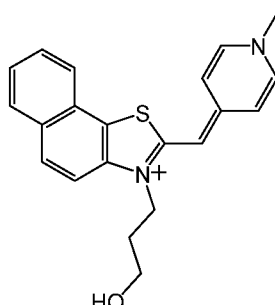


化学式 XII

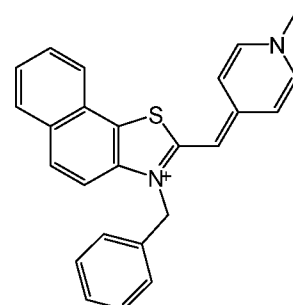
10



化学式 XIII

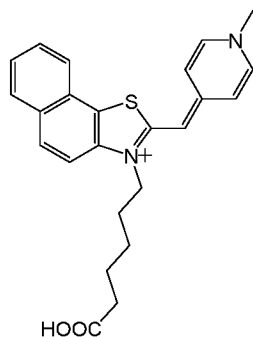


化学式 XIV

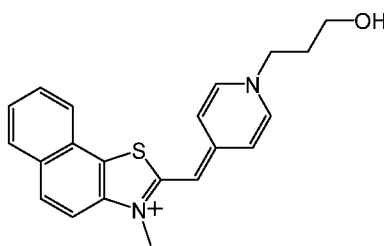


化学式 XV

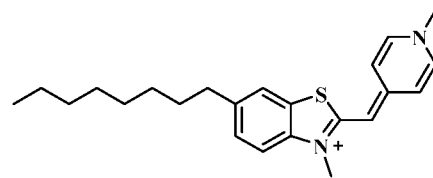
15



化学式 XVI



化学式 XVII



化学式 XVIII

- 5 本申请的荧光染料可以溶解在甘油、甘醇、乙二醇中并作为储存液保存，也可以溶解在其它非水溶剂中。本发明优选使用乙二醇作为溶剂，并任选含有 5-10% 的甲醇作为稀释液的成分。此外，为了防止荧光染料聚集，本发明还可任选包含非离子表面活性剂作为分散剂，使荧光染料保持一定的溶解度，不产生聚集。这种非离子表面活性剂例如为聚氧乙烯乙二
- 10 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。本发明优选使用 Brij 35、Brij56 等作为荧光染料的分散剂，浓度为 0.02-2%。

或者，本申请的荧光染料可与红细胞溶解剂或球形化试剂配制在一起，形成单组分试剂。

15

红细胞溶解剂

使用的红细胞溶解剂可包含阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂或它们的任何组合，以及缓冲剂，其将测定体系的 pH 保持在 5-11。

- 20 可采用阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂或它们的任何组合，作为溶解红细胞的试剂。它们可溶解血液样本中红细胞，并且适当破坏各亚群白细胞的膜结构，使血液中白细胞的各亚群收缩成适当的大小，促进白细胞内部结构产生不同的凝聚，造成散射光特性的差别。阳离子表面活性剂可以为辛基三甲基溴化铵(OTAB)、癸基三甲基溴化铵(DTAB)、十二烷基三甲基氯化铵(LTAC)、十四烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十四烷基三
- 25 甲基氯化铵(CTAC)等，优选为 LTAC，使用浓度为 300-800mg/L。非离子表面活性剂可采用聚氧乙烯型非离子表面活性剂，如长链脂肪醇聚氧乙烯、烷基酚聚氧乙烯醚、脂肪酸聚氧乙烯酯、脂肪胺聚氧乙烯醚等，优选非离子表面活性剂为聚氧乙烯-2, 3-十二烷基醚(Brij35)，使用浓度为 1-5g/L。阴离子表

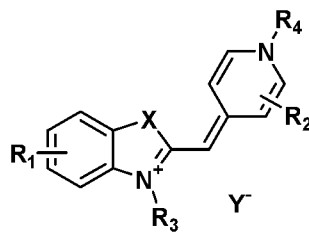
面活性剂选自十二烷基苯磺酸、脂肪醇酰硫酸钠、乙氧基化脂肪酸甲酯磺酸钠、仲烷基磺酸钠、醇醚羧酸盐，使用浓度为 0.1-2g/L。

本申请的试剂中可含有保持 pH 并对血液样本进行适当稀释的缓冲液。缓冲液使 pH 保持在恒定范围内，由此可稳定各亚群白细胞的染色效果，缓冲剂的使用浓度在 0.01-200mM 范围内。对缓冲液的种类并没有特别限定，只要它们可适用于本发明的目的，例如适当浓度的羧酸盐类、磷酸盐类、柠檬酸盐类、Tris-HCl、MOPS 以及其它有机缓冲剂等。本发明试剂中的合适 pH 因所选择的具体荧光染料不同而有所不同，一般在 pH 5.0-11.0 范围内，优选的 pH 是 8.0-10.0。

本发明的红细胞溶解剂还可任选包含适当比例的醇，如甲醇，以促进白细胞内部结构的凝聚。

白细胞检测试剂盒

在另一方面，本发明还提供用于能够区分和计数血液中的白细胞的试剂盒，所述试剂盒包含白细胞分类试剂，所述白细胞分类试剂包含具有式 F 所示结构的荧光染料：



式 F

其中，X 选自由 C(CH₃)₂、O、S 和 Se 组成的组；

R₁ 和 R₂ 各自独立地选自由 H、C₁-C₁₈ 烷基、苯基、OR₆ 和卤素组成的组；

R₃ 和 R₄ 各自独立地选自由 C₁-C₁₈ 烷基、C₁-C₁₈ 羧基、C₁-C₁₈ 羟基、C₁-C₁₈NR₅R₆、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C₁-C₁₈ 烷基、CN、COOH、NH₂、NO₂、OH、SH、C₁-C₆ 烷氧基、C₁-C₆ 烷基氨基、C₁-C₆ 酰氨基、卤素和 C₁-C₆ 卤代烷基组成的组；

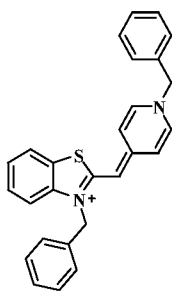
R₅ 和 R₆ 各自独立地选自由 H 和 C₁-C₁₈ 烷基组成的组；

Y⁻ 为负离子。

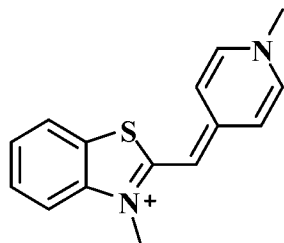
其他实施例中，X、R₁、R₂、R₃、R₄ 和 Y⁻ 的选择，同前文荧光染料部分

的描述所示。

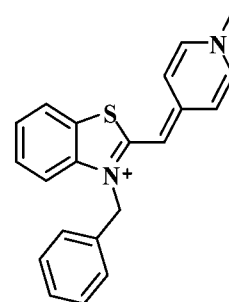
优选，荧光染料具有选自化学式 I、化学式 II、化学式 III、化学式 IV、化学式 V、化学式 VI、化学式 VII、化学式 VIII、化学式 IX、化学式 X、化学式 XI、化学式 XII、化学式 XIII、化学式 XIV、化学式 XV、化学式 XVI、化学式 XVII 和 化学式 XVIII 的结构，



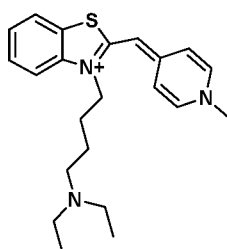
化学式 I



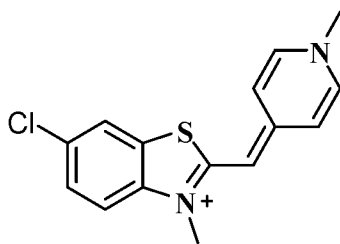
化学式 II



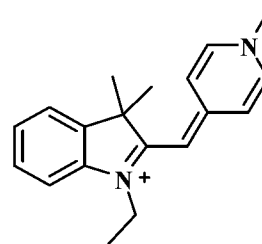
化学式 III



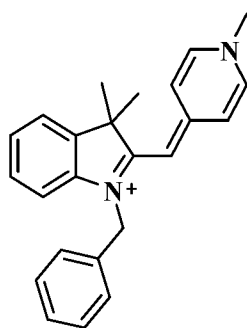
化学式 IV



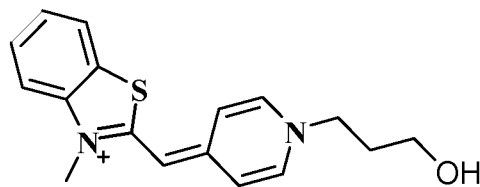
化学式 V



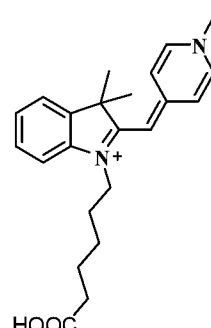
化学式 VI



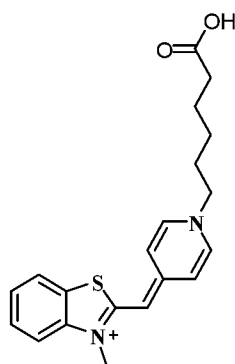
化学式 VII



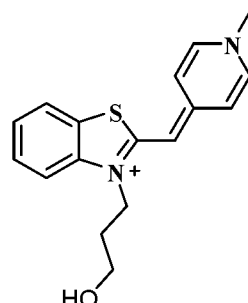
化学式 VIII



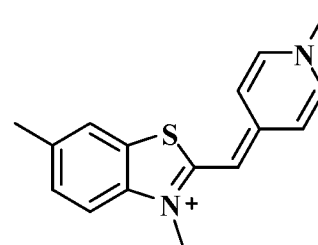
化学式 IX



化学式 X



化学式 XI



化学式 XII

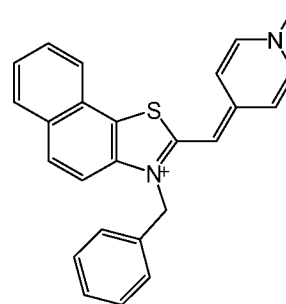
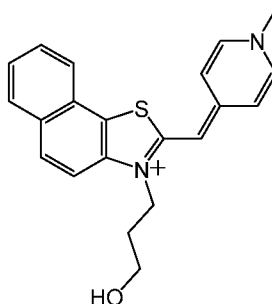
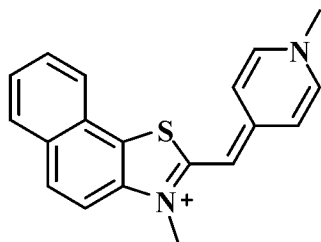
10

15

化学式 X

化学式 XI

化学式 XII

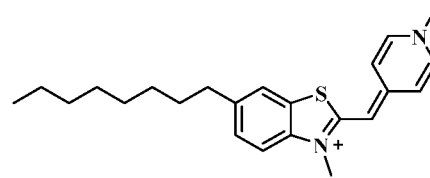
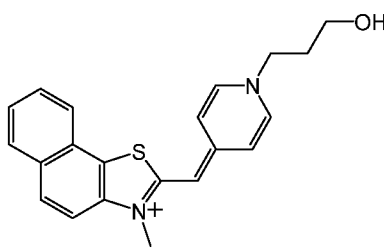
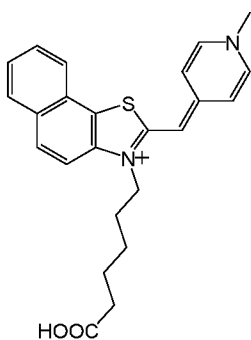


5

化学式 XIII

化学式 XIV

化学式 XV



化学式 XVI

化学式 XVII

化学式 XVIII

10

优选所述白细胞分类试剂还包含本文上述的红细胞溶解剂。

在一个实施方案中，所述荧光染料作为储存液形式存在，保存在单独的容器中。其中，所述荧光染料的浓度为：0.1-1000mg/L，优选 20-500mg/L，更优选 50-200 mg/L。

15 在另一个实施方案中，所述荧光染料与上述红细胞溶解剂一起配制为混合试剂溶液。

此试剂盒优选包含适于密封保持在至少一个容器中的分区存放的荧光染料。所述试剂盒还可包含将血液中白细胞分类所需的其它白细胞分类试剂以及测定白细胞的方法的说明。所述试剂盒还可包含可测定并与测试样品对比的对照样品或一系列对照样品。试剂盒的各组分可封装在单个容器中，不同容器连同说明一起全部在单独包装中，所述试剂盒用于分类和/或计数血液中的各类白细胞。

20

球形化试剂

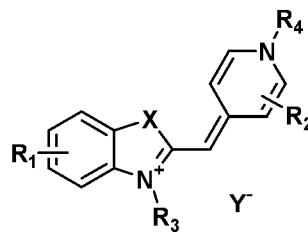
使用的球形化试剂可包含两性表面活性剂, 渗透压调节剂, 缓冲剂, 以及任选的阳离子表面活性剂和/或防腐剂。

球形化试剂中的表面活性剂使血细胞肿胀并轻微损伤细胞膜以便染料进入细胞。两性表面活性剂的浓度范围: 100-2000mg/L, 优选 100-500mg/L。两性表面活性剂可为烷基甜菜碱、磺酸基甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱等中一种或多种。阳离子表面活性剂可以为辛基三甲基溴化铵(OTAB)、癸基三甲基溴化铵(DTAB)、十二烷基三甲基氯化铵(LTAC)、十四烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十四烷基三甲基氯化铵(CTAC)等, 使用浓度为 0-50mg/L。渗透压调节剂可为: 氯化钠、硫酸钠等常用盐类, 渗透压范围为:

200mOsm/kg-380mOsm/kg。对缓冲液的种类并没有特别限定, 只要它们可适用于本发明的目的, 例如适当浓度的羧酸盐类、磷酸盐类、柠檬酸盐类、Tris-HCl、MOPS 以及其它有机缓冲剂等。本发明试剂中的合适 pH 因所选择的具体荧光染料不同而有所不同, 一般在 pH 5.0-11.0 范围内, 优选的 pH 是 8.0-10.0。

红细胞检测试剂盒

在另一方面, 本发明还提供用于能够区分和计数血液中的红细胞的试剂盒, 尤其是对网织红细胞识别和计数, 所述试剂盒包含红细胞分析试剂, 所述红细胞分析试剂包含具有式 F 所示结构的荧光染料:



式 F

其中, X 选自由 $C(CH_3)_2$ 、O、S 和 Se 组成的组;

R_1 和 R_2 各自独立地选自由 H、 C_1 - C_{18} 烷基、苯基、 OR_6 和卤素组成的组;

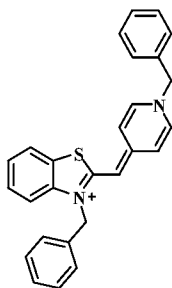
R_3 和 R_4 各自独立地选自由 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 羧基、 C_1 - C_{18} 羟基、 C_1 - $C_{18}NR_5R_6$ 、苄基和取代苄基组成的组, 其中所述取代苄基的取代基选自由 C_1 - C_{18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷基氨基、 C_1 - C_6 酰氨基、卤素和 C_1 - C_6 卤代烷基组成的组;

R_5 和 R_6 各自独立地选自由 H 和 C_1 - C_{18} 烷基组成的组；

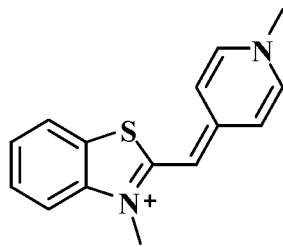
Y 为负离子。

其他实施例中， X 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 Y^- 的选择，同前文荧光染料部分的描述所示。

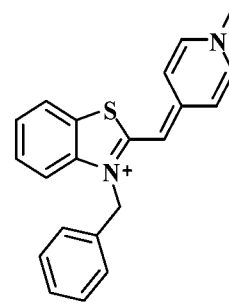
- 5 优选，荧光染料具有选自化学式 I、化学式 II、化学式 III、化学式 IV、化学式 V、化学式 VI、化学式 VII、化学式 VIII、化学式 IX、化学式 X、化学式 XI、化学式 XII 和化学式 XIII 的结构，



化学式 I

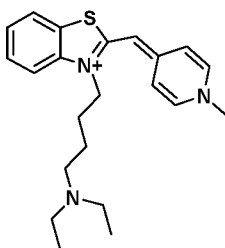


化学式 II

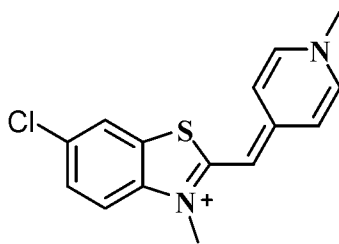


化学式 III

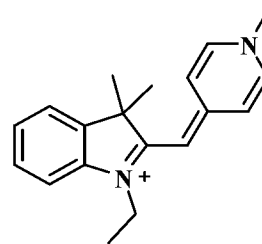
10



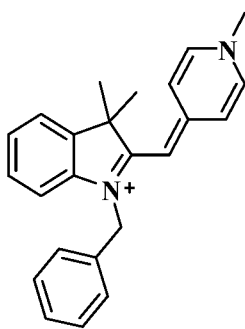
化学式 IV



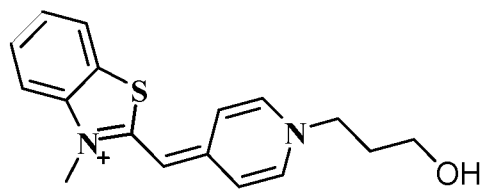
化学式 V



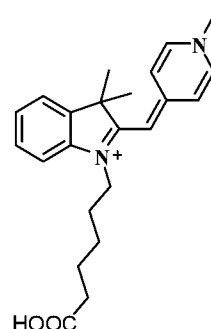
化学式 VI



化学式 VII

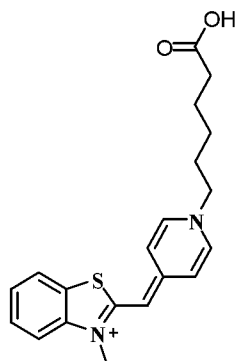


化学式 VIII

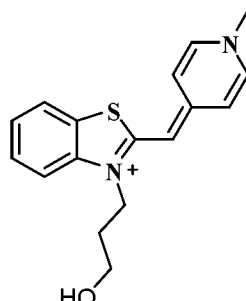


化学式 IX

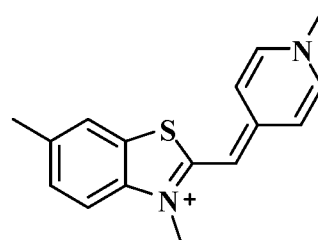
15



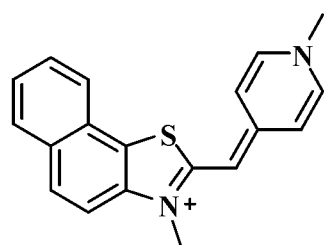
化学式 X



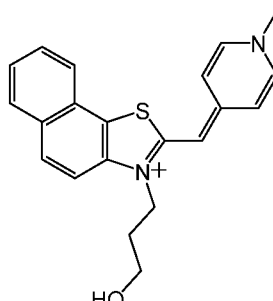
化学式 XI



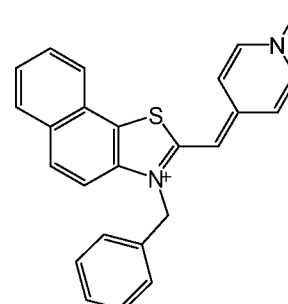
化学式 XII



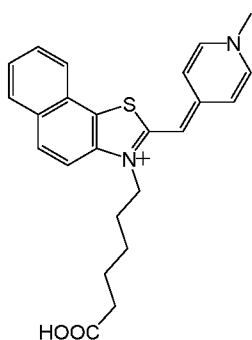
化学式 XIII



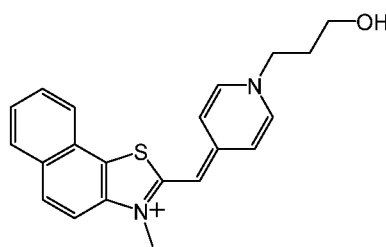
化学式 XIV



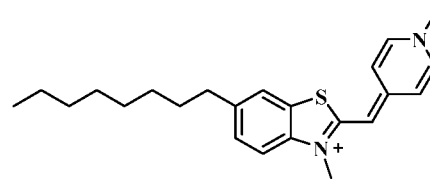
化学式 XV



化学式 XVI



化学式 XVII



化学式 XVIII

优选所述红细胞分析试剂还包含本文上述的球形化试剂。

在一个实施方案中，所述荧光染料作为储存液形式存在，保存在单独的容器中。其中，所述荧光染料的浓度为：0.1-1000mg/L，优选 20-500mg/L，更优选 50-200 mg/L。

在另一个实施方案中，所述荧光染料与上述球形化试剂一起配制为混合试剂溶液。

此试剂盒优选包含适于密封保持在至少一个容器中的分区存放的荧光染料。所述试剂盒还可包含将血液中红细胞分类所需的其它红细胞分类试剂以

及测定红细胞的方法的说明。所述试剂盒还可包含可测定并与测试样品对比的对照样品或一系列对照样品。试剂盒的各组分可封装在单个容器中，不同容器连同说明一起全部在单独包装中，所述试剂盒用于分类和/或计数血液中的各类红细胞，如成熟红细胞和/或网织红细胞。

5

使用方法：

A：本申请还提供分类和/或计数血液中白细胞的方法。简单地说，在本申请的方法中，通过将血液样本与白细胞分类试剂混合，随后测定样品的至少一种散射光特性和至少一种荧光特性，并根据散射光特性和荧光特性将样品分类和/或计数。

10

本申请方法中使用的血液样本可以是全血，也可以是成分血。可使血液样品先与红细胞溶解剂混合，使得红细胞被溶解，各亚群的白细胞产生不同程度的皱缩。该步骤同时在待测定白细胞的细胞膜上形成小孔，这种小孔足以允许荧光染料分子通过细胞膜。

15

随后加入荧光染料储存液，使得白细胞被荧光标记。在血液样本与试剂混合时，血液样本与试剂的总体积应保证足够的细胞浓度通过仪器的测量池。本申请的试剂组合物将血液样本稀释至 1：10、1：50 或 1：100 或以上任何范围中的任何值，只要该稀释符合实际使用的要求。这种调整在本领域技术人员的范围内。此外，也可使血液样品与红细胞溶解剂和荧光染料同时混合。

20

样品混合物可在孵育池中进行温育，温育时间不超过 60 秒，优选 30 秒，24 秒；温育温度可为任何合适的温度，例如 40°C。可采用血液分析仪或流式细胞仪检测和分析白细胞，经过溶解、稀释并染色的血液样品导入测量仪器的流动室中，光源发出的光照射所述流动室中的粒子产生光学信息，检测器用于收集所述光学信息，所述光学信息包括至少一种散射光和至少一种荧光。

25

本申请中的散射光是指可由市售血液分析仪或类似的流式细胞仪检测的散射光。这种散射光包括但不限于侧向散射光、正向低角度散射光(接受光角度为约 0-5 度)和正向高角度散射光(接受光角度为约 5-20 度)。具有这种角度的散射光反映了白细胞大小或内部结构的信息，因此用作本发明的散射光。优选侧向散射光。

30

与细胞中核酸结合的荧光染料发射荧光。荧光特性是反映血液样本中细胞内荧光染料量的参数。由于不同亚群的细胞内代谢活动不同，而造成核酸

含量的差异，因此不同亚群的白细胞的荧光特性在某些方面具有差异。取决于所使用的具体染料选择合适的激发光波长，并监测相应波长的发射光。本申请对白细胞检测时，可采用绿色或蓝色半导体激光器发射的绿色或蓝色波长区域激光为检测的光源。对所述绿色或蓝色波长的光源没有特殊的限制，只要能够发出所选择荧光染料的激发波长附近的绿色光（例如约波长 501-560nm 的光）或者或蓝色光（例如约波长 400-500nm 的光）。例如，光源可以配置为发射波长约为 450nm 或 520nm 的光。这类激光器相对于其它激光器成本较低，这样可降低设备的成本。

利用散射光特性和荧光特性识别各亚群白细胞，并对各聚类散点进行相关的分类计数，计算各亚群白细胞的百分比。散射光反映细胞内部颗粒程度，细胞内部的颗粒程度大致为：嗜酸细胞内部有两分叶核并且内部有很多酸性染料染色的脆质微粒；中性粒细胞核(分叶或杆状)且内部颗粒较多；单核细胞为单大核内部颗粒较少；LYM 细胞单大核基本没有颗粒。所以相同条件下各类白细胞的散射光强度特性顺序为 EO(嗜酸细胞)>NEUT(中性粒细胞)>MONO(单核细胞)>LYM(淋巴细胞)。

B：本申请还提供分类和/或计数血液中红细胞的方法。简单地说，在本申请的方法中，通过将血液样本与红细胞分析试剂混合，随后测定样品的至少一种散射光特性和至少一种荧光特性，并根据散射光特性和荧光特性将样品分类和/或计数。

本申请方法中使用的血液样本可以是全血，也可以是成分血。可使血液样品先与球形化试剂混合，使得红细胞和白细胞肿胀并轻微损伤细胞膜，在红细胞和白细胞的细胞膜上形成小孔，这种小孔足以允许荧光染料分子通过细胞膜。

随后加入荧光染料储存液，使得红细胞和白细胞被荧光标记。由于成熟红细胞、网织红细胞、和白细胞的核酸含量不同，所以荧光特性不同，可以将上述三种细胞区分开来。在血液样本与试剂混合时，血液样本与本申请试剂的总体积应保证足够的细胞浓度通过仪器的测量池。本申请的试剂组合物将血液样本稀释至 1：10、1：50 或 1：100 或以上任何范围中的任何值，只要该稀释符合实际使用的要求。这种调整在本领域技术人员的范围内。此外，也可使血液样品与球形化试剂和荧光染料同时混合。

样品混合物可在孵育池中进行温育，温育时间不超过 60 秒，优选 30 秒、

24 秒；温育温度可为任何合适的温度，例如 40°C。可采用血液分析仪或流式细胞仪检测和分析红细胞，经过球形化处理并染色的血液样品导入测量仪器的流动室中，光源发出的光照射所述流动室中的粒子产生光学信息，检测器用于收集所述光学信息，所述光学信息包括至少一种散射光和至少一种荧光。

5 本申请中的散射光是指可由市售血液分析仪或类似的流式细胞仪检测的散射光。这种散射光包括但不限于侧向散射光、正向低角度散射光(接受光角度为约 0-5 度)和正向高角度散射光(接受光角度为约 5-20 度)。具有这种角度的散射光反映了细胞大小或内部结构的信息，因此用作本发明的散射光。优选前向散射光。

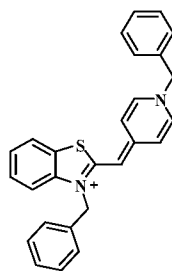
10 本申请对红细胞检测时，同样可采用绿色或蓝色半导体激光器发射的绿色或蓝色波长区域激光为检测的光源。

利用散射光特性和荧光特性识别成熟红细胞、网织红细胞以及血小板，并对各聚类散点进行相关的分类计数，获得红细胞（包括成熟红细胞和网织红细胞）计数、网织红细胞计数以及血小板计数。前向散射光反应细胞体积大小的信息，血小板体积比红细胞小，其前向散射光强度相对较弱；成熟红
15 细胞和网织红细胞核酸 RNA 含量不同，网织红细胞核酸 RNA 含量相对较高，其荧光强度相对较高。

实施例 1

20 染料的合成

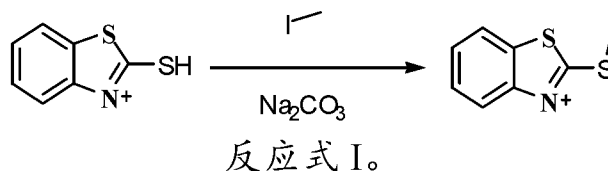
示例性的荧光染料通过以下方式合成，制备具有化学式 I 所示的结构
的化合物 A，



化学式 I。

25 在本实施方式中，X 为 S，R₁ 为 H，R₂ 为 H，R₃ 为苄基，R₄ 为苄基。化合物 A 的具体制备方法如下：

第一步，根据下述反应式 I 制备 2-甲硫基苯并噻唑（反应 I 右侧），

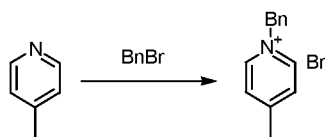


量取 20mL 的 DMF 放入容器中，将 10mmol 的 2-巯基苯并噻唑（反应式 I 左侧）、11mmol 的甲烷以及 12mmol 的碳酸钠加入容器。在氮气保护及温度为 110℃ 的条件下搅拌反应 8 小时，之后停止反应。

将得到的混合物冷却至室温，之后将其倾入大量水中。使用适量的乙酸乙酯萃取 3 次，合并萃取的有机相。使用蒸馏水洗涤上述有机相两次，之后用无水硫酸镁对其进行干燥过夜。

然后将干燥过夜后的物质经过色谱柱纯化，得到约 8.5mmol 的橙黄色固体粉末，该橙黄色固体粉末即为 2-甲巯基苯并噻唑。反应式 I 的产率约为 85%。

第二步，根据下述反应式 II 制备 1-苄基-4-甲基吡啶季铵盐（反应式 II 右侧），

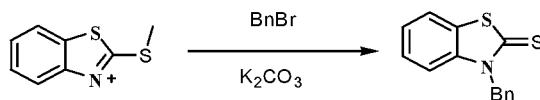


在容器中量取 50mL 甲苯，将 10mmol 的 4-甲基吡啶（反应式 II 左侧）和 12mmol 的苄溴加入到容器中。在氮气保护的条件下回流并搅拌 8 小时，之后停止反应。

对反应后的混合物进行抽滤，之后使用 50mL 甲苯洗涤滤饼 3 次，得到粗产物。

将上述粗产物经过色谱柱纯化后得到约 7.3mmol 的白色固体粉末，白色固体粉末即为 1-苄基-4-甲基吡啶季铵盐。该反应式 II 的产率约为 73%。

第三步，根据下述反应式 III 制备 3-苄基-2-硫酮苯并噻唑（反应式 III 右侧），

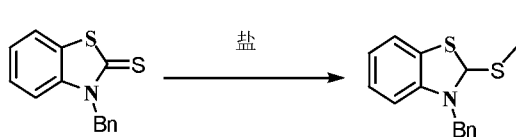


量取 30mL 甲苯放入容器中，将 3mmol 的第一步反应得到的 2-甲巯基苯并噻唑（反应式 III 左侧）、4mmol 的苄溴以及 5mmol 的碳酸钾加入到容器中。在氮气保护及温度为 110℃ 的条件下搅拌反应 8 小时。

对反应后的混合物进行抽滤，之后使用 50mL 甲苯洗涤滤饼 3 次，得粗产物。

将上述粗产物经过色谱柱纯化后得到约 2.1mmol 的白色固体粉末，该白色固体粉末即为 3-苄基-2-硫酮苯并噻唑，反应式 III 的产率约为 70%。

5 第四步，根据下述反应式 IV 制备 3-苄基-2-乙硫基苯并噻唑（反应式 IV 右侧），

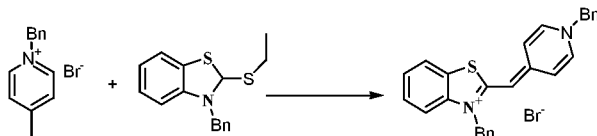


反应式 IV。

10 在容器中量取 30mL 二氯甲烷，将 2mmol 的第三步反应得到的 3-苄基-2-硫酮苯并噻唑以及 2mmol 的镁盐加入到容器中。在氮气保护的条件下回流搅拌 24 小时。

产物经过色谱柱纯化后得到约 1.1mmol 的白色固体粉末，该白色固体粉末即为 3-苄基-2-乙硫基苯并噻唑。反应式 IV 的产率约为 55%。

第五步，根据下述反应式 V 制备化合物 A（反应式 V 右侧），



15

反应式 V。

在容器中量取 30mL 的乙醇，称取第二步反应得到的 1-苄基-4-甲基吡啶季铵盐 1mmol，称取第四步反应得到的 3-苄基-2-乙硫基苯并噻唑 1mmol，将二者加入到容器中。

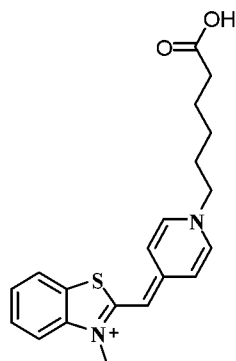
20 在氮气保护地条件下回流搅拌 24 小时。产物经色谱柱纯化后得到约 0.3mmol 橙黄色固体粉末，该橙黄色固体粉末即为化合物 A。反应式 V 的产率约为 30%。

对化合物 A 进行核磁共振测试，结果如下。

1H-NMR (500MHz, DMSO, TMS) : δ 4.00 (s, 3H), 5.59 (s, 2H),
25 6.39 (s, 1H), 7.26-7.31 (m, 4H), 7.35-7.38 (t, 2H), 7.40-7.42 (d, 2H), 7.45-7.48 (t, 1H), 7.52-7.54 (d, 1H), 7.94-7.96 (d, 1H), 8.33-8.35 (d, 2H)。

实施例 2

30 制备具有化学式 X 所示的结构化合物 J，



化学式 X

在本实施方式中，X 为 S，R₁ 为 H，R₂ 为 H，R₃ 为羧基戊基，R₄ 为甲基。

5 化合物 J 的具体制备方法如下：

第一步，在 50mL 容量的圆底烧瓶中装 10mL 乙酸乙酯，将 5.37mmol 的 4-甲基吡啶和 10.7mmol 的 6-溴己酸加入到上述圆底烧瓶中，并在 80℃ 的条件下回流反应 8h。使用乙酸乙酯对得到的混合物进行重结晶并抽滤，抽滤过程中使用乙酸乙酯充分洗涤。将得到的滤出物用甲醇溶解，之后进行蒸干。最终干燥后得到黄色油性液体，其为 1-(5-羧基戊基)-4-甲基吡啶，其粗收率约为 91.07%。

第二步，在 50mL 容量的圆底烧瓶中装 10mL 无水四氢呋喃，将 11.84mmol 的 2-巯基苯并噻唑加入到该圆底烧瓶中，之后在搅拌的状态下缓慢向圆底烧瓶中滴加 14.21mmol 的碘甲烷，反应过夜。之后在反应得到的混合物中加入少量石油醚并静置沉淀。之后过滤，并用大量石油醚洗涤滤出物。最终将滤出物干燥后得到白色固体，其为 2-甲硫基苯并噻唑，其粗收率约为 98%。

第三步，在 50mL 容量的圆底烧瓶中盛装 10mL 甲苯，将 10mmol 的 2-甲硫基苯并噻唑加入到上述圆底烧瓶中。之后在氮气保护下，向该圆底烧瓶中缓慢滴加 12mmol 的碘甲烷，并在 110℃ 及回流的条件下持续反应 24h。将反应得到的混合物冷却到室温，之后对混合物进行过滤，并用二氯甲烷洗涤滤出物。最终将滤出物干燥后得到微黄色固体粉末，其为 3-甲基-2-甲硫基苯并噻唑，其粗收率约为 30%。

第四步，在 25mL 容量的圆底烧瓶中加入 5mL 二氯甲烷。将 0.500mmol 的 3-甲基-2-甲硫基苯并噻唑与 0.509mmol 的 1-(5-羧基戊基)-4-甲基吡啶加入到上述圆底烧瓶中。在室温以及避光的条件下搅拌 10min 后，再向其中缓慢滴加 756μL 三乙胺，之后在室温及避光的条件下反应 21h 左右。之后

将反应得到的混合物蒸干，剩余物通过中性硅胶柱进行分离，其中使用二氯甲烷和甲醇混合溶剂作为洗脱液。收集分离后的黄色组分并对其蒸干干燥，最终得到棕黄色粘稠物，即为化合物 J，其粗收率 50%。

对化合物 J 进行核磁共振测试，结果如下。

- 5 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO) : δ 8.36 (s, 1H) , 7.90 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.58 (d, J=8.0Hz, 1H) , 7.51 (t, J=7.4Hz, 1H) , 7.40 (s, 1H) , 7.30 (t, J=7.1Hz, 1H) , 6.25 (s, 1H) , 4.21 (s, 1H) , 3.72 (s, 3H) , 2.10 (s, 1H) , 1.82 (s, 1H) , 1.53 (s, 1H) , 1.28 (s, 1H) 。

10 实施例 3:

试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A: 荧光染料储存液:

- | | | |
|----|----------------|-------|
| | 荧光染料 (具有化学式 I) | 50mg |
| 15 | 乙二醇 | 950ml |
| | 甲醇 | 50ml |

B: 红细胞溶解剂溶液

- | | | |
|----|------------|------|
| | 十四烷基三甲基氯化铵 | 0.5g |
| 20 | TRIS | 18g |
| | HCl | 20ml |
| | 水 | 1L |
| | Brij 35 | 1.5g |
| | pH 值 | 7.0 |

25

C: 球形化试剂溶液

- | | | |
|----|-----------|-------|
| | 一水合磷酸二氢钠 | 53mg |
| | 七水合磷酸氢二钠 | 160mg |
| | 椰油酰胺丙基甜菜碱 | 100mg |
| 30 | 水 | 1L |
| | pH 值 | 8.5 |

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器)中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

- 5 具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (1 号血液样本) 的测试结果如图 1 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群
- 10 的分类识别, 图 1 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

- 测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样
- 15 量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

- 具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测
- 20 试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (1 号血液样本) 的测试结果如图 2 所示, 表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别, 图 2 中标注的三团粒子分别为红细胞 (即成熟红细胞), 网织红细胞 (RET) 和血小板, 表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别, 尤其是 RET 的识别。

- 25 3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

用同样一支血样 (1 号血液样本) 在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试, 采用 BC-6800 仪器配套试剂, 分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示:

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 3 配置试剂的测试结果
----	---------------	-----------------

淋巴细胞百分比 (%)	37.8	37.2
单核细胞百分比 (%)	8.1	8.3
中性粒细胞百分比 (%)	52.9	52.7
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	1.2	1.3
网织红细胞百分比 (%)	0.8	1.1

从表中可以看出, 具有化学式 I 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

实施例 4:

5 试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A: 荧光染料储存液:

荧光染料 (具有化学式 II) 50mg

乙二醇 950ml

10 甲醇 50ml

B: 红细胞溶解剂溶液

十二烷基三甲基氯化铵 0.5g

TRIS 18g

15 HCl 20ml

水 1L

Brij 35 1.5g

pH 值 7.0

20 C: 球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg

七水和磷酸氢二钠 160mg

烷基甜菜碱 100mg

水 1L

25 pH 值 8.5

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (2 号血液样本) 的测试结果如图 3 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群的分类识别, 图 3 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (2 号血液样本) 的测试结果如图 4 所示, 表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别, 图 4 中标注的三团粒子分别为红细胞 (即成熟红细胞), 网织红细胞 (RET) 和血小板, 表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别, 尤其是 RET 的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

用同样一支血样 (2 号血液样本) 在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试, 采用 BC-6800 仪器配套试剂, 分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示:

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 4 配置试剂的测
----	---------------	--------------

		测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	44.1	43.6
单核细胞百分比 (%)	4.2	4.3
中性粒细胞百分比 (%)	51.1	53.3
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	0.6	0.7
网织红细胞百分比 (%)	0.9	1.1

从表中可以看出, 具有化学式 II 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

实施例 5:

5 试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A: 荧光染料储存液:

荧光染料 (具有化学式 III) 50mg

乙二醇 950ml

10 甲醇 50ml

B: 红细胞溶解剂溶液

十二烷基三甲基氯化铵 0.5g

TRIS 18g

15 HCl 20ml

水 1L

Brij 35 1.5g

pH 值 7.0

20 C: 球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg

七水和磷酸氢二钠 160mg

烷基甜菜碱 100mg

水 1L

pH 值

8.5

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

5 测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

10 具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (3 号血液样本) 的测试结果如图 5 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群的分类识别, 图 5 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

15 2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

20 具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (3 号血液样本) 的测试结果如图 6 所示, 表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别, 图 6 中标注的三团粒子分别为红细胞 (即成熟红细胞), 25 网织红细胞 (RET) 和血小板, 表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别, 尤其是 RET 的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

30 用同样一支血样 (3 号血液样本) 在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试, 采用 BC-6800 仪器配套试剂, 分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示:

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 5 配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	33.9	33.2
单核细胞百分比 (%)	8.7	8.3
中性粒细胞百分比 (%)	57	58
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	0.4	0.5
网织红细胞百分比 (%)	0.3	0.4

从表中可以看出,具有化学式 III 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

实施例 6:

5 试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A: 荧光染料储存液:

荧光染料 (具有化学式 IV) 100mg

乙二醇 950ml

10 甲醇 50ml

B: 红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵 0.5g

TRIS 18g

15 HCl 20ml

水 1L

Brij 35 1.5g

pH 值 7.0

20 C: 球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg

七水和磷酸氢二钠 160mg

烷基甜菜碱 100mg

水 1L
pH 值 8.5

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

5 测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

10 具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (4 号血液样本) 的测试结果如图 7 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群
15 的分类识别, 图 7 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

20 具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (4 号血液样本) 的测试结果如图 8 所示, 表明本申请可以实现红细胞和
25 血小板的分类识别, 图 8 中标注的三团粒子分别为红细胞 (即成熟红细胞), 网织红细胞 (RET) 和血小板, 表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别, 尤其是 RET 的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

30 用同样一支血样 (4 号血液样本) 在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试, 采用 BC-6800 仪器配套试剂, 分别检测得到的白细胞和红细胞相

关参数如下表所示：

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 6 配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	40.2	39.8
单核细胞百分比 (%)	12.3	11.9
中性粒细胞百分比 (%)	46.8	47.8
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	0.6	0.5
网织红细胞百分比 (%)	0.5	0.6

从表中可以看出,具有化学式 IV 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

5 实施例 7:

试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A: 荧光染料储存液:

荧光染料 (具有化学式 V) 500mg

10 乙二醇 950ml

甲醇 50ml

B: 红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵 0.5g

15 TRIS 18g

HCl 20ml

水 1L

Brij 35 1.5g

pH 值 7.0

20

C: 球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg

七水和磷酸氢二钠 160mg

烷基甜菜碱 100mg
水 1L
pH 值 8.5

5 1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (5 号血液样本) 的测试结果如图 9 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群
10 的分类识别, 图 9 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。
15

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。
20

具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (5 号血液样本) 的测试结果如图 10 所示, 表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别, 图 10 中标注的三团粒子分别为红细胞 (即成熟红细胞), 网织红细胞 (RET) 和血小板, 表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别, 尤其是 RET 的识别。
25

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。
30

用同样一支血样 (5 号血液样本) 在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式

进行测试, 采用 BC-6800 仪器配套试剂, 分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示:

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 7 配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	28.6	29.2
单核细胞百分比 (%)	10.5	10.7
中性粒细胞百分比 (%)	59.8	58.8
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	1.1	1.3
网织红细胞百分比 (%)	0.3	0.3

从表中可以看出, 具有化学式 V 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

5

实施例 8:

试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A: 荧光染料储存液:

10 荧光染料 (具有化学式 VI) 50mg
 乙二醇 950ml
 甲醇 50ml

B: 红细胞溶解剂溶液

15 十四烷基三甲基氯化铵 0.5g
 TRIS 18g
 HCl 20ml
 水 1L
 Brij 35 1.5g
 20 pH 值 7.0

C: 球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg

七水和磷酸氢二钠 160mg

烷基甜菜碱 100mg

水 1L

pH 值 8.5

5

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

10

具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (6 号血液样本) 的测试结果如图 11 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群

15 的分类识别, 图 11 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (6 号血液样本) 的测试结果如图 12 所示, 表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别, 图 12 中标注的三团粒子分别为红细胞 (即成熟红细胞), 网织红细胞 (RET) 和血小板, 表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别, 尤其是 RET 的识别。

30

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

用同样一支血样（6号血液样本）在迈瑞BC-6800仪器上按照CDR模式进行测试，采用BC-6800仪器配套试剂，分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示：

参数	BC-6800的测试结果	实施例8配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比（%）	37.7	37.2
单核细胞百分比（%）	40.6	41.3
中性粒细胞百分比（%）	21.2	20.9
嗜酸性粒细胞百分比（%）	0.5	0.6
网织红细胞百分比（%）	0.4	0.4

从表中可以看出，具有化学式VI的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试 results 与BC-6800的测试结果较为一致。

实施例9：

试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

10 A：荧光染料储存液：

荧光染料（具有化学式VII） 250mg

乙二醇 950ml

甲醇 50ml

15 B：红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵 0.5g

TRIS 18g

HCl 20ml

水 1L

20 Brij 35 1.5g

pH值 7.0

C：球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg
 七水和磷酸氢二钠 160mg
 烷基甜菜碱 200mg
 水 1L

5 pH 值 8.5

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (7 号血液样本) 的测试结果如图 13 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群的分类识别, 图 13 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (7 号血液样本) 的测试结果如图 14 所示, 表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别, 图 14 中标注的三团粒子分别为红细胞 (即成熟红细胞), 网织红细胞 (RET) 和血小板, 表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别, 尤其是 RET 的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和

结果。

用同样一支血样（7号血液样本）在迈瑞BC-6800仪器上按照CDR模式进行测试，采用BC-6800仪器配套试剂，分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示：

参数	BC-6800的测试结果	实施例9配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比（%）	36.3	37.2
单核细胞百分比（%）	10.2	11.0
中性粒细胞百分比（%）	52.4	50.5
嗜酸性粒细胞百分比（%）	1.1	1.3
网织红细胞百分比（%）	0.1	0.1

- 5 从表中可以看出，具有化学式VII的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与BC-6800的测试结果较为一致。

实施例10：

试剂的配制

- 10 配制如下组成的试剂体系。

A：荧光染料储存液：

荧光染料（具有化学式VIII） 50mg

乙二醇 950ml

甲醇 50ml

15

B：红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵 0.5g

TRIS 18g

HCl 20ml

20

水 1L

Brij 35 1.5g

pH值 7.0

C: 球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg

七水和磷酸氢二钠 160mg

烷基甜菜碱 100mg

5 水 1L
pH 值 8.5

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

10 测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定
15 测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (8 号血液样本) 的测试结果如图 15 所示, 表明本申请可以实现白细胞 5 个亚群的分类识别, 图 15 中标注的五团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

20 2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即
25 加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (8 号血液样本) 的测试结果如图 16 所示, 表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别, 图 16 中标注的三团粒子分别为红细胞 (即成熟红细胞),
30 网织红细胞 (RET) 和血小板, 表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别, 尤其是 RET 的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

用同样一支血样（8 号血液样本）在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试，采用 BC-6800 仪器配套试剂，分别检测得到的白细胞和红细胞相

5 关参数如下表所示：

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 10 配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	33.6	33.2
单核细胞百分比 (%)	10.2	10.8
中性粒细胞百分比 (%)	54.1	54.0
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	1.1	1.2
嗜碱性粒细胞百分比 (%)	1.0	0.8
网织红细胞百分比 (%)	1.2	1.1

从表中可以看出，具有化学式 VIII 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

实施例 11：

10 试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A：荧光染料储存液：

荧光染料（具有化学式 IX） 50mg

乙二醇 950ml

15 甲醇 50ml

B：红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵 0.5g

TRIS 18g

20 HCl 20ml

水 1L

Brij 35 1.5g
pH 值 7.0

C: 球形化试剂溶液

5 一水合磷酸二氢钠 53mg
 七水和磷酸氢二钠 160mg
 椰油酰胺丙基甜菜碱 100mg
 水 1L
 pH 值 8.5

10

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

15 具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (9 号血液样本) 的测试结果如图 17 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群
20 的分类识别, 图 17 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

25 测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

30 具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (9 号血液样本) 的测试结果如图 18 所示, 表明本申请可以实现红细胞和

血小板的分类识别,图 18 中标注的三团粒子分别为红细胞(即成熟红细胞),网织红细胞(RET)和血小板,表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别,尤其是 RET 的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

用同样一支血样(9 号血液样本)在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试,采用 BC-6800 仪器配套试剂,分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示:

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 11 配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	39.4	39.2
单核细胞百分比 (%)	8.8	8.5
中性粒细胞百分比 (%)	49.7	50.0
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	2.1	2.3
网织红细胞百分比 (%)	0.8	0.7

从表中可以看出,具有化学式 IX 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

实施例 12:

试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

15 A: 荧光染料储存液:

荧光染料(具有化学式 X) 50mg

乙二醇 950ml

甲醇 50ml

20 B: 红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵 0.5g

TRIS 18g

HCl 20ml

水	1L
Brij 35	1.5g
pH 值	7.0

5 C: 球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg

七水和磷酸氢二钠 160mg

烷基甜菜碱 100mg

水 1L

10 pH 值 8.5

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (10 号血液样本) 的测试结果如图 19 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群的分类识别, 图 19 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

25 测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样

本（10 号血液样本）的测试结果如图 20 所示，表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别，图 20 中标注的三团粒子分别为红细胞（即成熟红细胞），网织红细胞（RET）和血小板，表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别，尤其是 RET 的识别。

- 5 3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

用同样一支血样（10 号血液样本）在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试，采用 BC-6800 仪器配套试剂，分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示：

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 12 配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	39.3	39.9
单核细胞百分比 (%)	12.4	12.1
中性粒细胞百分比 (%)	42.2	41.8
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	6.1	6.2
网织红细胞百分比 (%)	1.9	2.1

- 10 从表中可以看出，具有化学式 X 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

实施例 13：

试剂的配制

- 15 配制如下组成的试剂体系。

A：荧光染料储存液：

荧光染料（具有化学式 XI） 50mg

乙二醇 950ml

甲醇 50ml

20

B：红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵 0.5g

TRIS 18g

HCl	20ml
水	1L
Brij 35	1.5g
pH 值	7.0

5

C: 球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg

七水和磷酸氢二钠 160mg

烷基甜菜碱 100mg

10

水 1L

pH 值 8.5

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (11 号血液样本) 的测试结果如图 21 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群的分类识别, 图 21 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

25 2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测

试样本的前向散射光强度和荧光强度，得到包含红细胞的散点图。对血液样本（11号血液样本）的测试结果如图22所示，表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别，图22中标注的三团粒子分别为红细胞（即成熟红细胞），网织红细胞（RET）和血小板，表明本申请红细胞检测试剂能够实现红

5 细胞和血小板的分类和识别，尤其是RET的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞BC-6800仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

用同样一支血样（11号血液样本）在迈瑞BC-6800仪器上按照CDR模式进行测试，采用BC-6800仪器配套试剂，分别检测得到的白细胞和红细胞

10 相关参数如下表所示：

参数	BC-6800的测试结果	实施例13配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比(%)	40.1	39.8
单核细胞百分比(%)	9.3	10.0
中性粒细胞百分比(%)	48.4	48.1
嗜酸性粒细胞百分比(%)	2.2	2.1
网织红细胞百分比(%)	1.1	1.0

从表中可以看出，具有化学式XI的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与BC-6800的测试结果较为一致。

实施例14：

试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A：荧光染料储存液：

荧光染料（具有化学式XII） 1000mg

乙二醇 950ml

20 甲醇 50ml

B：红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵 0.5g

	TRIS	18g
	HCl	20ml
	水	1L
	Brij 35	1.5g
5	pH 值	7.0

C: 球形化试剂溶液

一水合磷酸二氢钠 53mg

七水和磷酸氢二钠 160mg

10	椰油酰胺丙基甜菜碱	100mg
	水	1L
	pH 值	8.5

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

15 测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成
20 测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (12 号血液样本) 的测试结果如图 23 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群的分类识别, 图 23 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。
25

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

30 具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测

定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器，激发波长为 450nm，测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度，得到包含红细胞的散点图。对血液样本（12 号血液样本）的测试结果如图 24 所示，表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别，图 24 中标注的三团粒子分别为红细胞（即成熟红细胞），网织红细胞（RET）和血小板，表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别，尤其是 RET 的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

用同样一支血样（12 号血液样本）在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试，采用 BC-6800 仪器配套试剂，分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示：

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 14 配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	33.1	33.3
单核细胞百分比 (%)	13.2	13.8
中性粒细胞百分比 (%)	52.2	51.5
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	1.5	1.4
网织红细胞百分比 (%)	0.8	0.9

从表中可以看出，具有化学式 XII 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

实施例 15：

试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A：荧光染料储存液：

荧光染料（具有化学式 XIII） 50mg

乙二醇 950ml

甲醇 50ml

B：红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵	0.5g
TRIS	18g
HCl	20ml
水	1L

5	Brij 35	1.5g
	pH 值	7.0

C: 球形化试剂溶液

	一水合磷酸二氢钠	53mg
10	七水和磷酸氢二钠	160mg
	烷基甜菜碱	100mg
	水	1L
	pH 值	8.5

15 1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40℃ 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (13 号血液样本) 的测试结果如图 25 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群

20 的分类识别, 图 25 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即

加入 20 微升荧光染料储存液，在 40℃下的孵育池中混匀孵育 30 秒，形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器，激发波长为 450nm，测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度，得到包含红细胞的散点图。对血液样本（13 号血液样本）的测试结果如图 26 所示，表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别，图 26 中标注的三团粒子分别为红细胞（即成熟红细胞），网织红细胞（RET）和血小板，表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别，尤其是 RET 的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

10 用同样一支血样（13 号血液样本）在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试，采用 BC-6800 仪器配套试剂，分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示：

参数	BC-6800 的测试结果	实施例 15 配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	40.6	40.5
单核细胞百分比 (%)	6.5	6.7
中性粒细胞百分比 (%)	51.7	51.4
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	1.2	1.4
网织红细胞百分比 (%)	0.7	0.7

从表中可以看出，具有化学式 XIII 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

15

实施例 16：

试剂的配制

配制如下组成的试剂体系。

A：荧光染料储存液：

20 荧光染料（具有化学式 XVIII） 50mg
 乙二醇 950ml
 甲醇 50ml

B: 红细胞溶解剂溶液

十四烷基三甲基氯化铵	0.5g
------------	------

TRIS	18g
------	-----

HCl	20ml
-----	------

5	水	1L
---	---	----

Brij 35	1.5g
---------	------

pH 值	7.0
------	-----

C: 球形化试剂溶液

10	一水合磷酸二氢钠	53mg
----	----------	------

七水和磷酸氢二钠	160mg
----------	-------

烷基甜菜碱	100mg
-------	-------

水	1L
---	----

pH 值	8.5
------	-----

15

1) 对血液样品中白细胞的测定和结果:

测试样本的过程在迈瑞自主研发的经改进的 BC-6000 血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 20 微升, 溶血剂溶液 B 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

20 具体为将 1ml 红细胞溶解剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40°C 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的侧向散射光强度和荧光强度, 得到白细胞散点图。对血液样本 (13 号血液样本) 的测试结果如图 25 所示, 表明本申请可以实现白细胞 4 个亚群

25 的分类识别, 图 25 中标注的四团粒子分别为淋巴细胞, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 表明本申请白细胞分类试剂能够实现白细胞各亚群的有效分类。

2) 对血液样品中红细胞的测定和结果:

30 测试样本的过程在迈瑞自主研发的血液分析仪器中自动进行, 设置吸样量为 4 微升, 球形化试剂溶液 C 进样量为 1ml, 荧光染料存储液 A 的进样量为 20 微升, 血样为经过抗凝处理的血液。

具体为将 1ml 球形化试剂与经过抗凝剂处理的 20 微升血液混匀, 并立即加入 20 微升荧光染料储存液, 在 40℃ 下的孵育池中混匀孵育 30 秒, 形成测定用试样。所述血液分析仪器带有蓝色激光器, 激发波长为 450nm, 测定测试样本的前向散射光强度和荧光强度, 得到包含红细胞的散点图。对血液样本 (13 号血液样本) 的测试结果如图 26 所示, 表明本申请可以实现红细胞和血小板的分类识别, 图 26 中标注的三团粒子分别为红细胞 (即成熟红细胞), 网织红细胞 (RET) 和血小板, 表明本申请红细胞检测试剂能够实现红细胞和血小板的分类和识别, 尤其是 RET 的识别。

3) 相同血液样品在迈瑞 BC-6800 仪器分别对白细胞和红细胞的测定和结果。

用同样一支血样 (13 号血液样本) 在迈瑞 BC-6800 仪器上按照 CDR 模式进行测试, 采用 BC-6800 仪器配套试剂, 分别检测得到的白细胞和红细胞相关参数如下表所示:

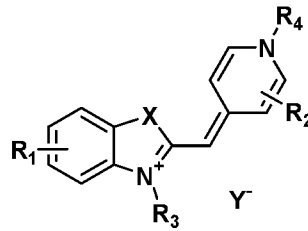
参数	BC-6800 的测试结果	实施例 15 配置试剂的测试结果
淋巴细胞百分比 (%)	42.6	42.5
单核细胞百分比 (%)	5.5	5.7
中性粒细胞百分比 (%)	50.7	50.4
嗜酸性粒细胞百分比 (%)	1.1	1.3
网织红细胞百分比 (%)	0.8	0.8

从表中可以看出, 具有化学式 XVIII 的荧光染料对白细胞分群和网织红细胞的测试结果与 BC-6800 的测试结果较为一致。

本发明已经通过上述实施例进行了说明, 但应当理解的是, 上述实施例只是用于举例和说明的目的, 而非意在将本发明限制于所描述的实施例范围内。此外本领域技术人员可以理解的是, 本发明并不局限于上述实施例, 根据本发明的教导还可以做出更多种的变型和修改, 这些变型和修改均落在本发明所要求保护的范围以内。本发明的保护范围由附属的权利要求书及其等效范围所界定。

权利要求书

1、一种白细胞分类试剂，所述试剂包含具有式 F 的荧光染料：



式 F

其中，X 选自由 C(CH₃)₂、O、S 和 Se 组成的组；

R₁ 和 R₂ 各自独立地选自由 H、C₁-C₁₈ 烷基、苯基、OR₆ 和卤素组成的组；

10 R₃ 和 R₄ 各自独立地选自由 C₁-C₁₈ 烷基、C₁-C₁₈ 羧基、C₁-C₁₈ 羟基、C₁-C₁₈NR₅R₆、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C₁-C₁₈ 烷基、CN、COOH、NH₂、NO₂、OH、SH、C₁-C₆ 烷氧基、C₁-C₆ 烷基氨基、C₁-C₆ 酰氨基、卤素和 C₁-C₆ 卤代烷基组成的组；

R₅ 和 R₆ 各自独立地选自由 H 和 C₁-C₁₈ 烷基组成的组；

15 Y 为负离子。

2、根据权利要求 1 所述的白细胞分类试剂，其特征在于，所述 X 选自由 C(CH₃)₂ 和 S 组成的组。

3、根据权利要求 1 所述的白细胞分类试剂，其特征在于，所述 R₁ 和所述 R₂ 各自独立地选自由 H、C₁-C₁₂ 烷基、苯基、OR₆ 和卤素组成的组；

20 优选地，所述 R₁ 和所述 R₂ 各自独立地选自由 H、C₁-C₆ 烷基、苯基、OR₆ 和卤素组成的组；

更优选地，所述 R₁ 选自由 H、C₁-C₆ 烷基、苯基、和卤素组成的组，所述 R₂ 为 H。

4、根据权利要求 1 所述的白细胞分类试剂，其特征在于，所述 R₃ 和
25 所述 R₄ 各自独立地选自由 C₁-C₁₂ 烷基、C₁-C₁₂ 羧基、C₁-C₁₂ 羟基、C₁-C₁₂NR₅R₆、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C₁-C₁₂ 烷基、CN、COOH、NH₂、NO₂、OH、SH、C₁-C₆ 烷氧基、C₁-C₆ 烷基氨基、C₁-C₆ 酰氨基、卤素和 C₁-C₆ 卤代烷基组成的组；

优选地，所述 R₃ 和所述 R₄ 各自独立地选自由 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 羧基、

C₁-C₆羟基、C₁-C₆NR₅R₆、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由C₁-C₆烷基、CN、COOH、NH₂、NO₂、OH、SH、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基氨基、C₁-C₆酰氨基、卤素和C₁-C₆卤代烷基组成的组；

更优选地，所述R₃选自由C₁-C₆烷基、C₁-C₆羟基、C₁-C₆羧基、

- 5 C₁-C₆NR₅R₆和苄基组成的组；所述R₄选自由C₁-C₆烷基、C₁-C₆羟基、C₁-C₆羧基、和苄基组成的组。

5、根据权利要求1所述的白细胞分类试剂，其特征在于，所述R₅和所述R₆各自独立地选自由H和C₁-C₁₂烷基组成的组；

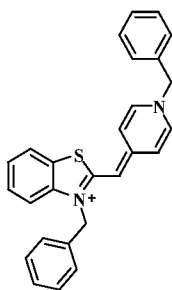
优选地，所述R₅和所述R₆各自独立地选自由H和C₁-C₆烷基组成的

10 组；

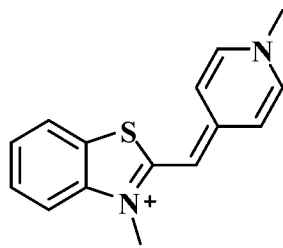
更优选地，所述R₅和所述R₆各自独立地为C₁-C₆烷基。

6、根据权利要求1所述的白细胞分类试剂，其特征在于，所述Y选自由卤素负离子、ClO₄⁻、PF₆⁻、BF₄⁻、CH₃COO⁻或OTs⁻组成的组。

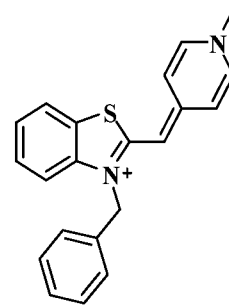
- 7、根据权利要求1所述的白细胞分类试剂，其特征在于，所述荧光
15 染料包含化学式I、化学式II、化学式III、化学式IV、化学式V、化学式VI、化学式VII、化学式VIII、化学式IX、化学式X、化学式XI、化学式XII、化学式XIII、化学式XIV、化学式XV、化学式XVI、化学式XVII和化学式XVIII中的至少一种所示的结构：



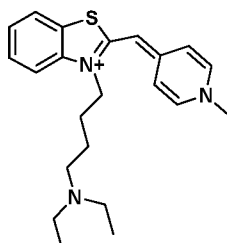
化学式 I



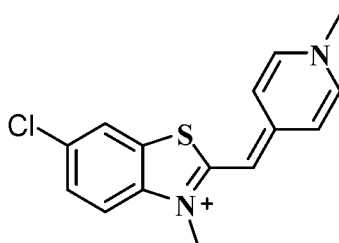
化学式 II



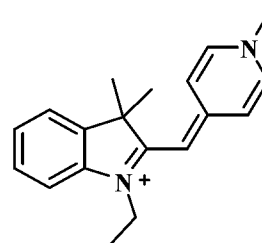
化学式 III



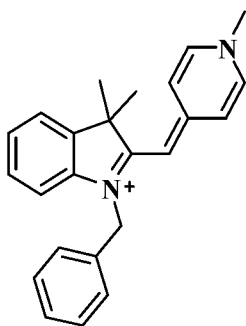
化学式 IV



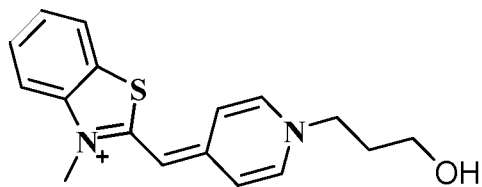
化学式 V



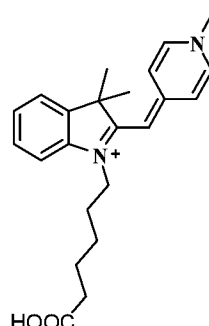
化学式 VI



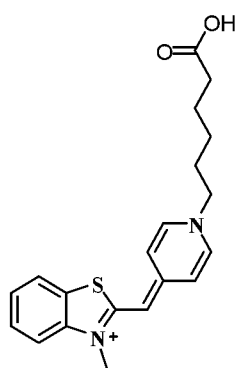
化学式 VII



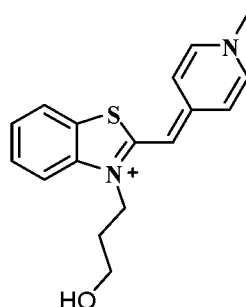
化学式 VIII



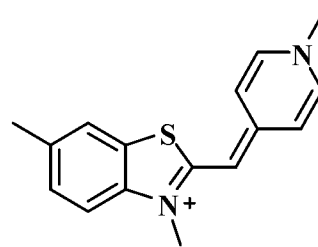
化学式 IX



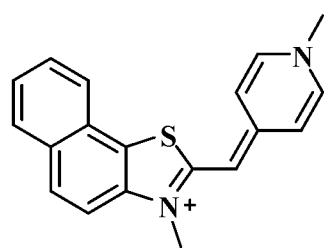
化学式 X



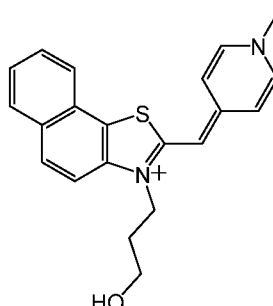
化学式 XI



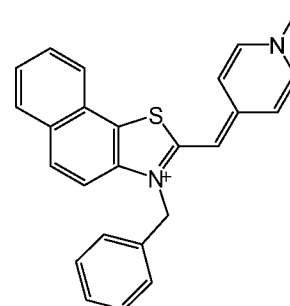
化学式 XII



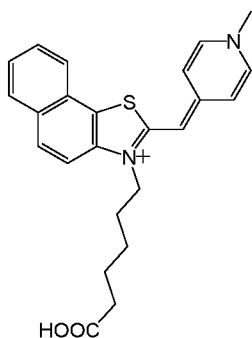
化学式 XIII



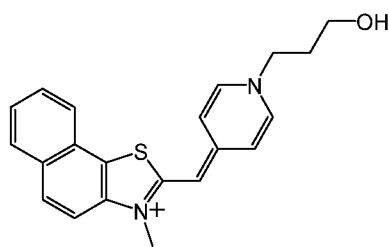
化学式 XIV



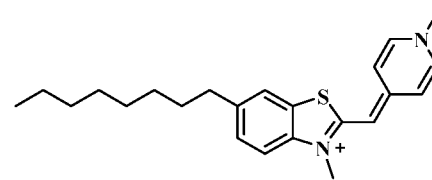
化学式 XV



化学式 XVI



化学式 XVII



化学式 XVIII。

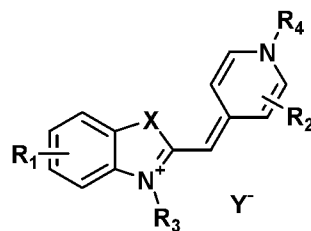
8、根据权利要求 1-7 任一项所述的白细胞分类试剂，其特征在于，所述分类试剂还包括红细胞溶解剂。

9、根据权利要求 1-8 任一项所述的白细胞分类试剂，其特征在于，所述荧光染料的浓度为：0.1-1000mg/L, 优选 20-500mg/L, 更优选 50-200 mg/L。

5 10、根据权利要求 8 所述的白细胞分类试剂，其特征在于，所述红细胞溶解剂包含阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂或它们的任何组合，以及缓冲剂，将测定体系的 pH 保持在 5-11。

11、一种白细胞分析试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 1-10 中任一项所述的白细胞分类试剂。

10 12、一种白细胞分类方法，所述方法包括：将血液样品、具有式 F 的荧光染料、和红细胞溶解剂混合形成待测试样；其中，式 F 为



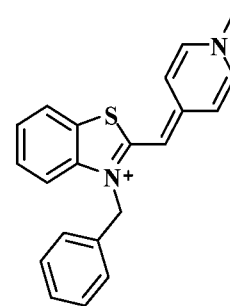
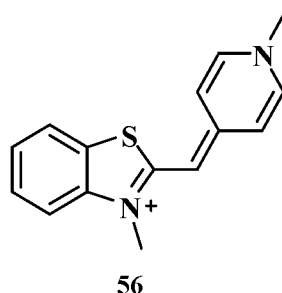
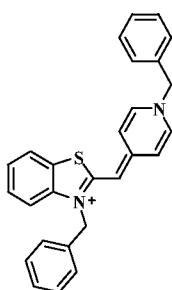
其中，X、R₁、R₂、R₃、R₄ 和 Y⁻ 如权利要求 1-6 中任一项所定义；

用光照射所述待测试样中的粒子，测定所述待测试样的至少一种散射光

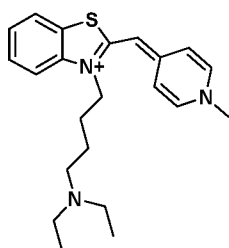
15 特性和至少一种荧光特性；

根据所述散射光特性和荧光特性对白细胞进行分类和/或计数。

13、根据权利要求 12 的所述方法，其中所述式 F 的荧光染料为：化学式 I、化学式 II、化学式 III、化学式 IV、化学式 V、化学式 VI、化学式 VII、化学式 VIII、化学式 IX、化学式 X、化学式 XI、化学式 XII、化学式 XIII、化学式 XIV、化学式 XV、化学式 XVI、化学式 XVII 和 化学式 XVIII 中的至少一种所示的结构：

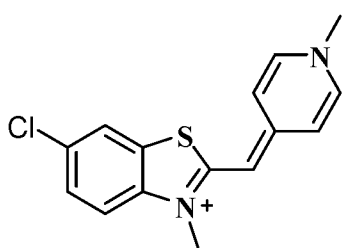


化学式 I



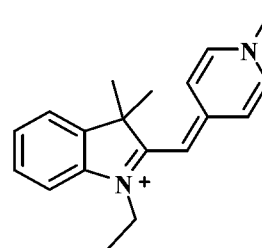
化学式 IV

化学式 II



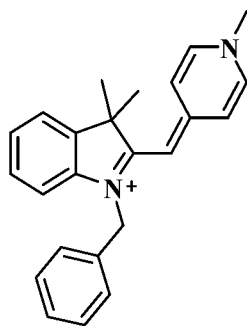
化学式 V

化学式 III

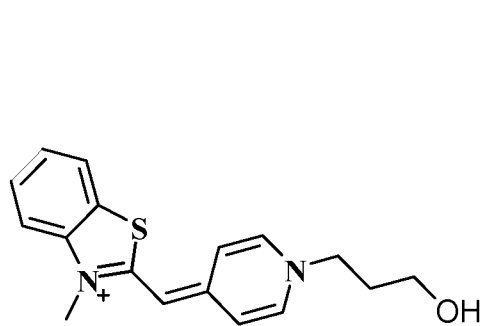


化学式 VI

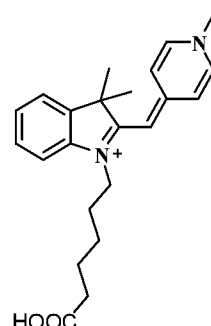
5



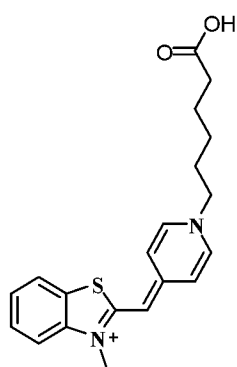
化学式 VII



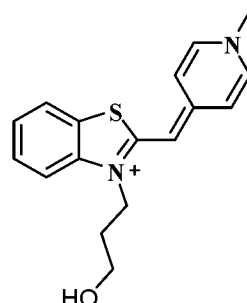
化学式 VIII



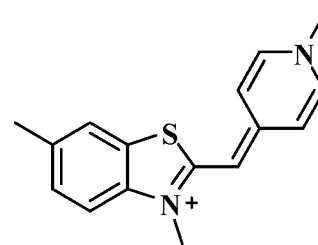
化学式 IX



化学式 X

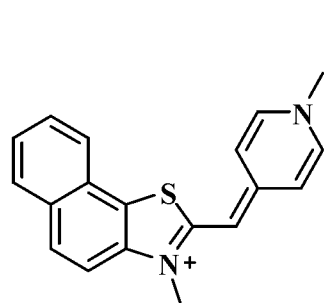


化学式 XI

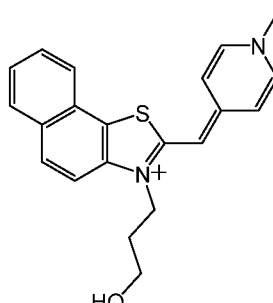


化学式 XII

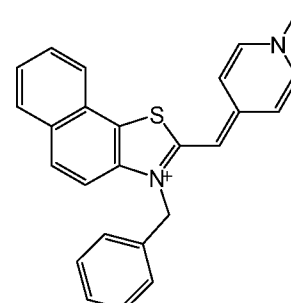
10



化学式 XIII

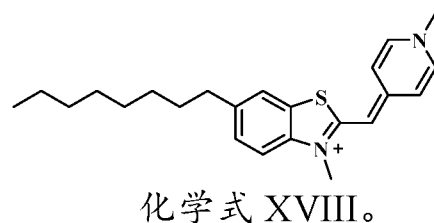
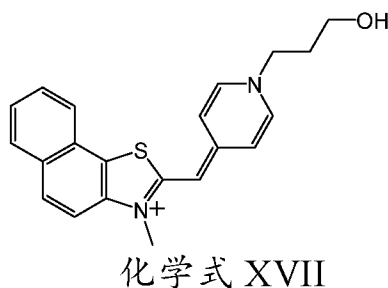
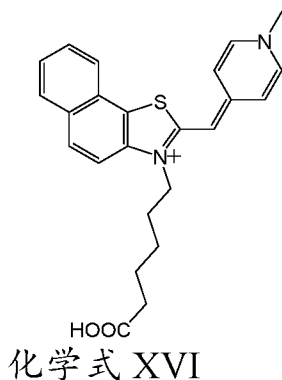


化学式 XIV



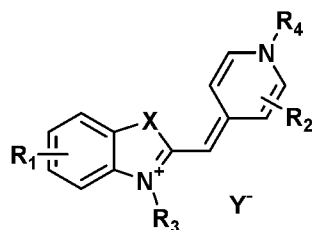
化学式 XV

15



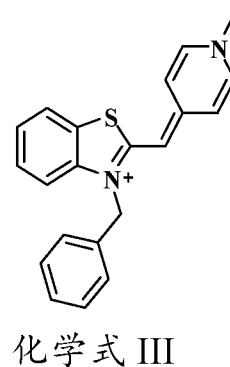
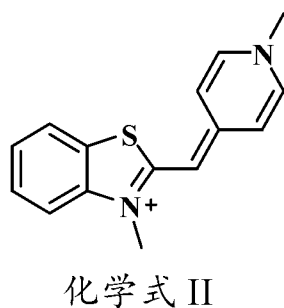
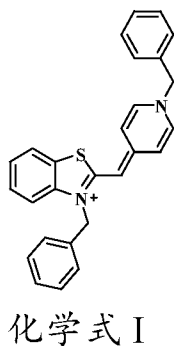
5 14、根据权利要求 12-13 任一项的所述方法，其特征在于：照射所述待测试样中的粒子的光为：蓝光、绿光或发射波长范围为 400-560 nm 的光。

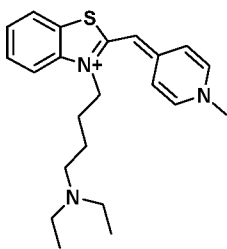
15、一种红细胞分析试剂，其特征在于，所述试剂包含具有式 F 的荧光染料；其中，式 F 为



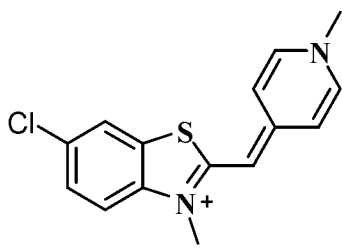
10 其中，X、R₁、R₂、R₃、R₄ 和 Y⁻ 如权利要求 1-6 中任一项所定义。

16、根据权利要求 15 所述的红细胞分析试剂，其特征在于，所述荧光染料包含化学式 I、化学式 II、化学式 III、化学式 IV、化学式 V、化学式 VI、化学式 VII、化学式 VIII、化学式 IX、化学式 X、化学式 XI、化学式 XII、化学式 XIII、化学式 XIV、化学式 XV、化学式 XVI、化学式 XVII 和
15 化学式 XVIII 中的至少一种所示的结构：

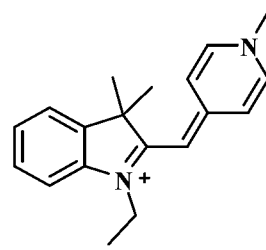




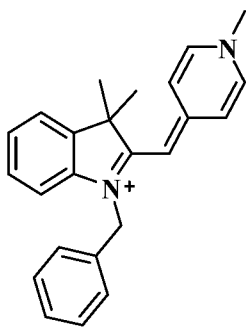
化学式 IV



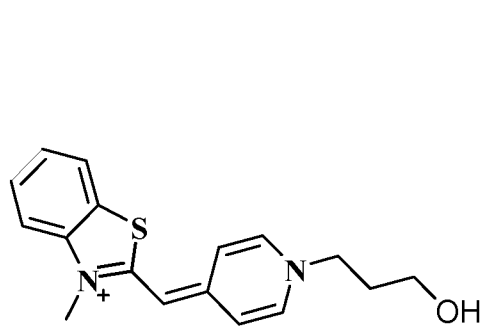
化学式 V



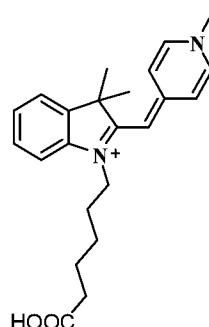
化学式 VI



化学式 VII

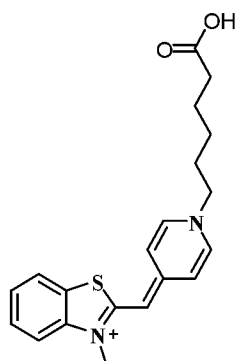


化学式 VIII

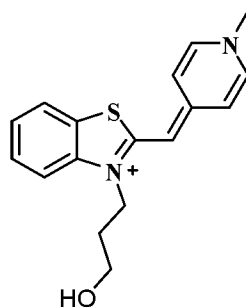


化学式 IX

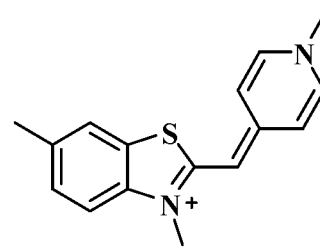
5



化学式 X

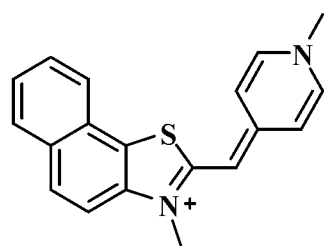


化学式 XI

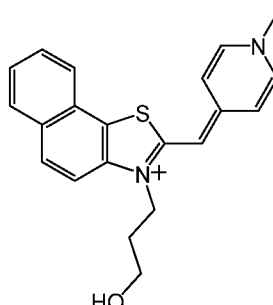


化学式 XII

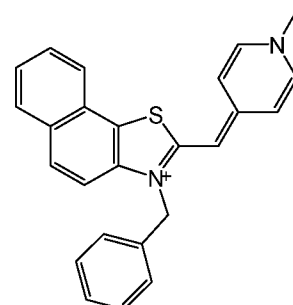
10



化学式 XIII

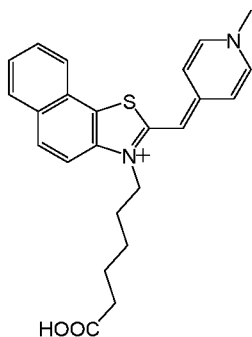


化学式 XIV

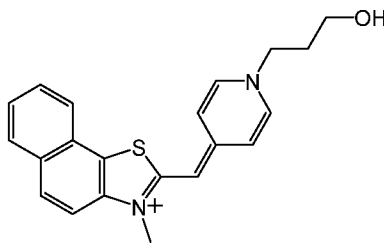


化学式 XV

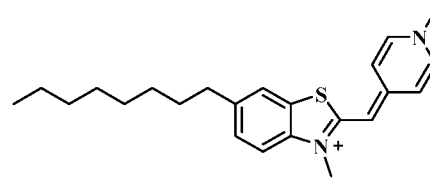
15



化学式 XVI



化学式 XVII



化学式 XVIII。

17、根据权利要求 15 所述的红细胞分析试剂，其特征在于，所述红细胞分析试剂还包括球形化试剂。

5 18、根据权利要求 17 所述的红细胞分析试剂，其特征在于，所述球形化试剂包括两性表面活性剂、渗透压调节剂及缓冲剂。

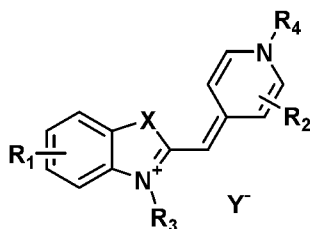
19、根据权利要求 15-18 任一项所述的红细胞分析试剂，其特征在于，所述荧光染料的浓度为：0.1-1000mg/L，优选 20-500mg/L，更优选 50-200 mg/L。

10 20、一种红细胞分析试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 15-19 任一项所述的红细胞分析试剂。

21、一种红细胞分析方法，包括：

将血液样品、具有式 F 的荧光染料、和球形化试剂混合形成待测试样；

其中，式 F 为



15

其中，X、R₁、R₂、R₃、R₄ 和 Y⁻如权利要求 1-6 中任一项所定义；

用光照射所述待测试样中的粒子，测定所述待测试样的至少一种散射光特性和至少一种荧光特性；

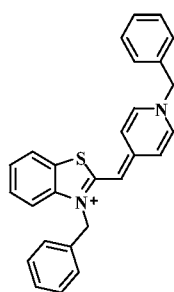
根据所述散射光特性和荧光特性获得红细胞分类和/或计数。

20 22、根据权利要求 21 所述的分析方法，其特征在于，所述红细胞分类包括：将红细胞区分为成熟红细胞和/或网织红细胞；所述红细胞计数包括：

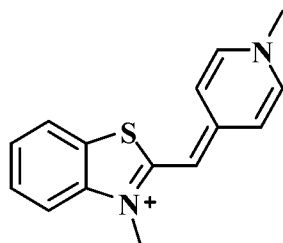
对成熟红细胞和/或网织红细胞的计数。

23、根据权利要求 22 所述的分析方法，其特征在于，根据所述散射光特性和荧光特性还能获得血小板的计数。

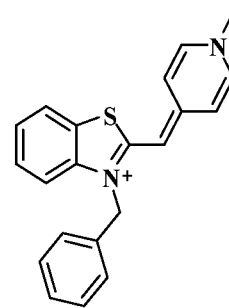
24、根据权利要求 21-23 任一项所述的分析方法，其特征在于，所述式 F 的荧光染料为：化学式 I、化学式 II、化学式 III、化学式 IV、化学式 V、化学式 VI、化学式 VII、化学式 VIII、化学式 IX、化学式 X、化学式 XI、化学式 XII、化学式 XIII、化学式 XIV、化学式 XV、化学式 XVI、化学式 XVII 和 化学式 XVIII 中的至少一种所示的结构：



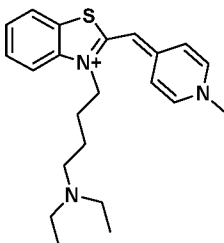
化学式 I



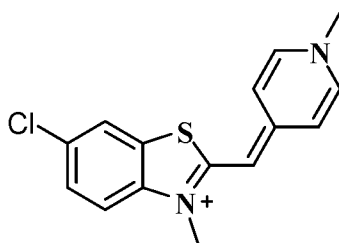
化学式 II



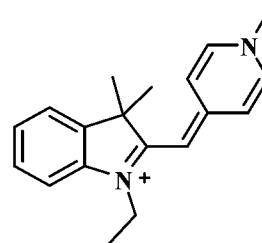
化学式 III



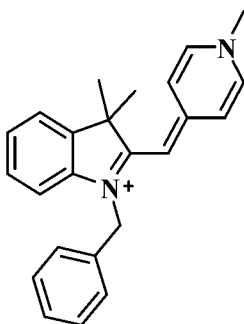
化学式 IV



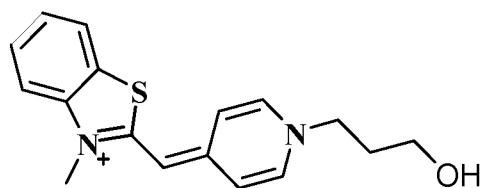
化学式 V



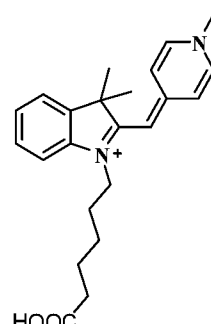
化学式 VI



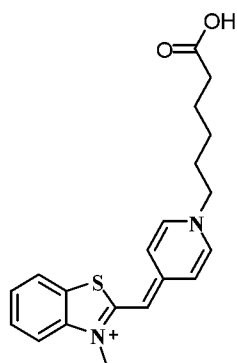
化学式 VII



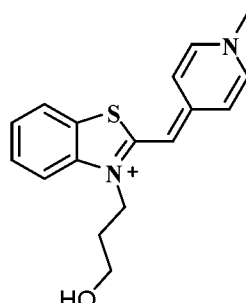
化学式 VIII



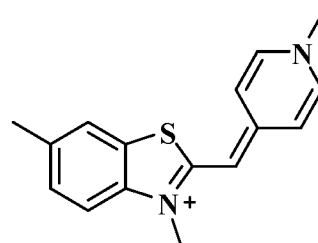
化学式 IX



化学式 X

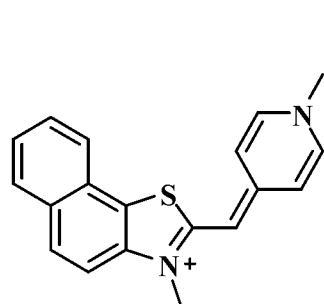


化学式 XI

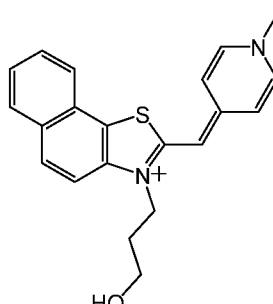


化学式 XII

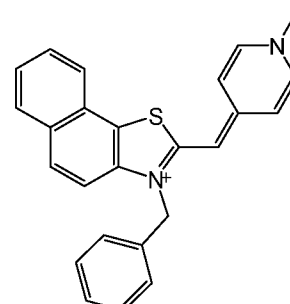
5



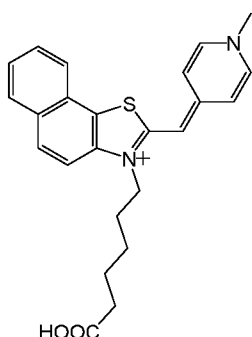
化学式 XIII



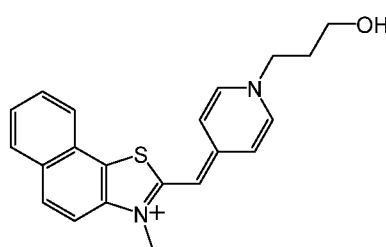
化学式 XIV



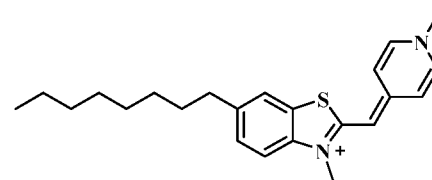
化学式 XV



化学式 XVI



化学式 XVII



化学式 XVIII。

10

25、根据权利要求 21-24 任一项的所述方法，其特征在于：照射所述待测试样中的粒子的光为：蓝光、绿光或发射波长范围为 400-560 nm 的光。

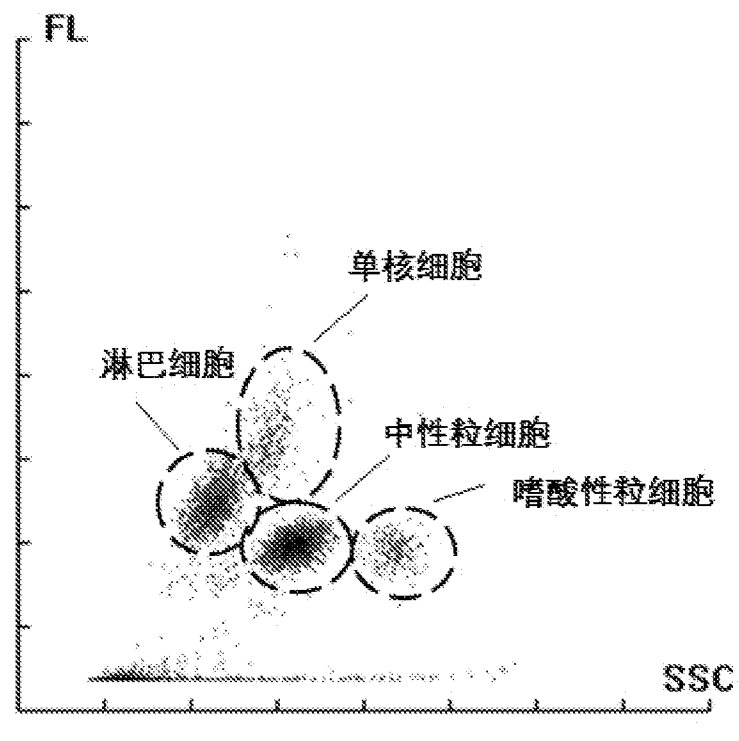


图 1

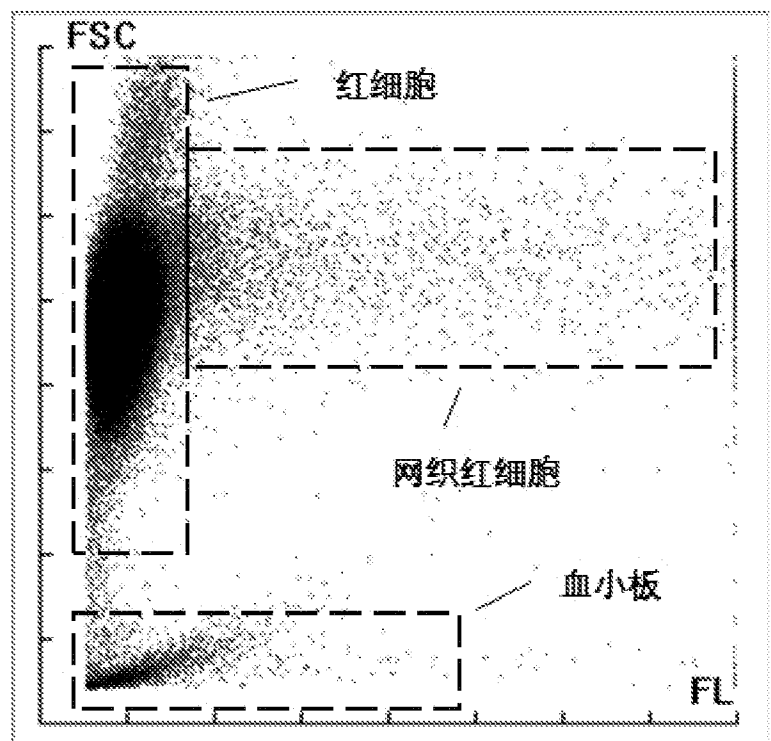


图 2

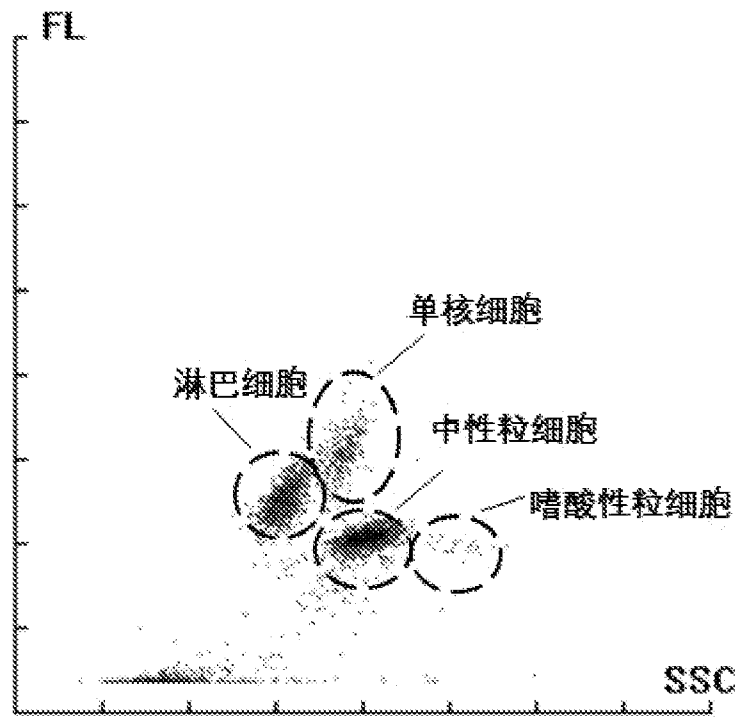


图 3

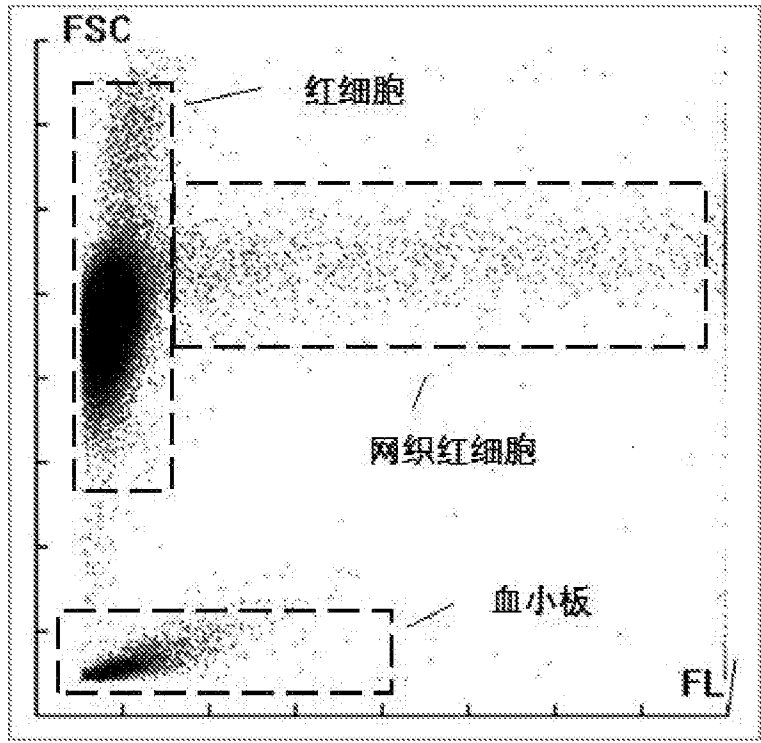


图 4

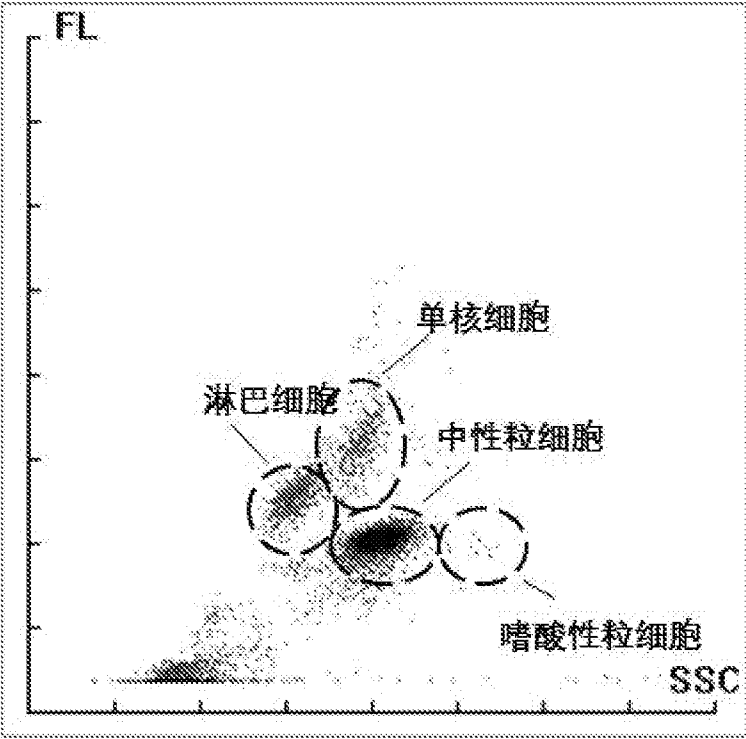


图 5

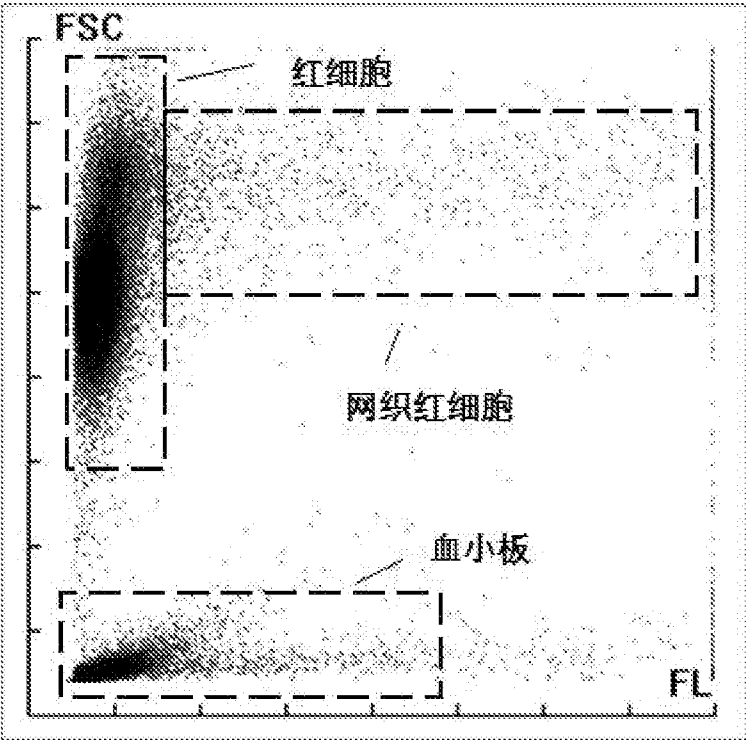


图 6

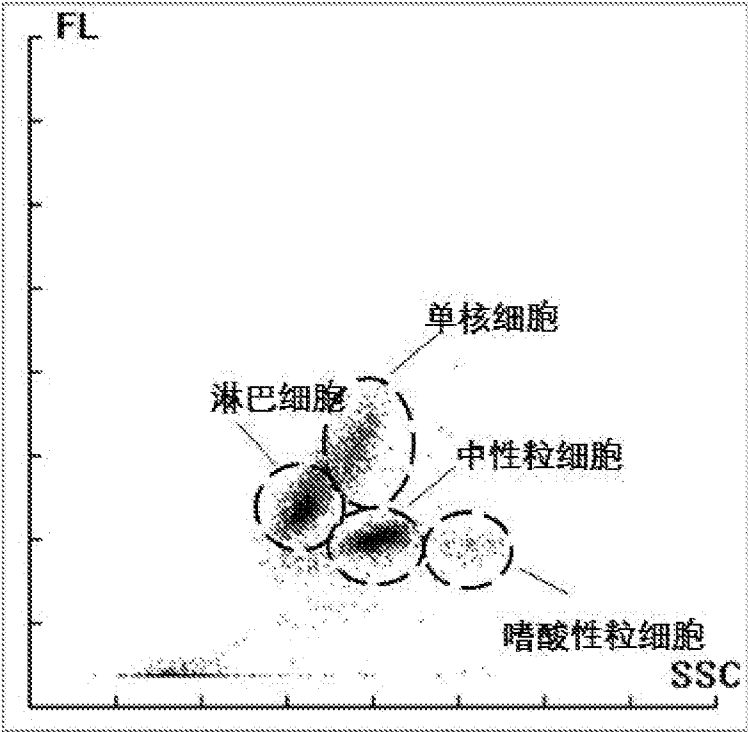


图 7

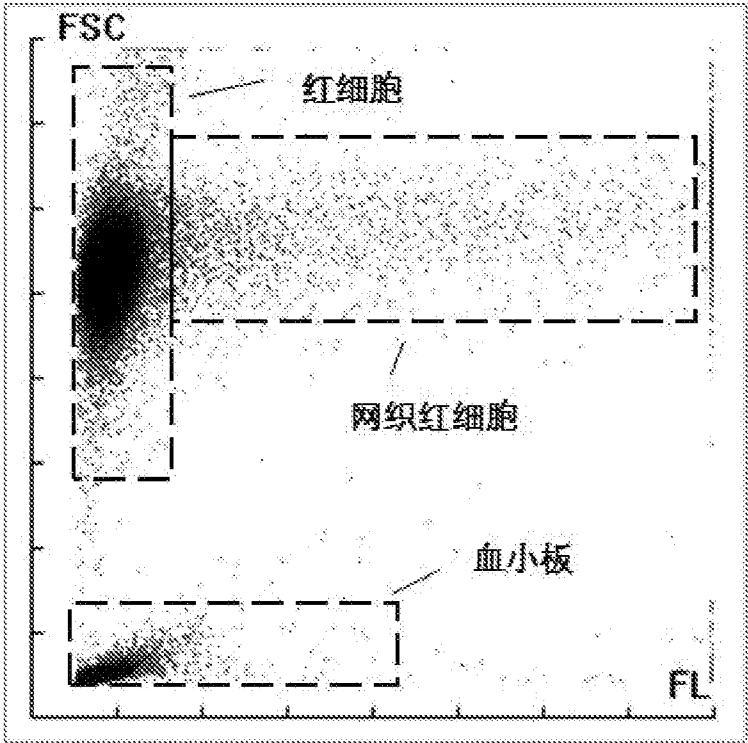


图 8

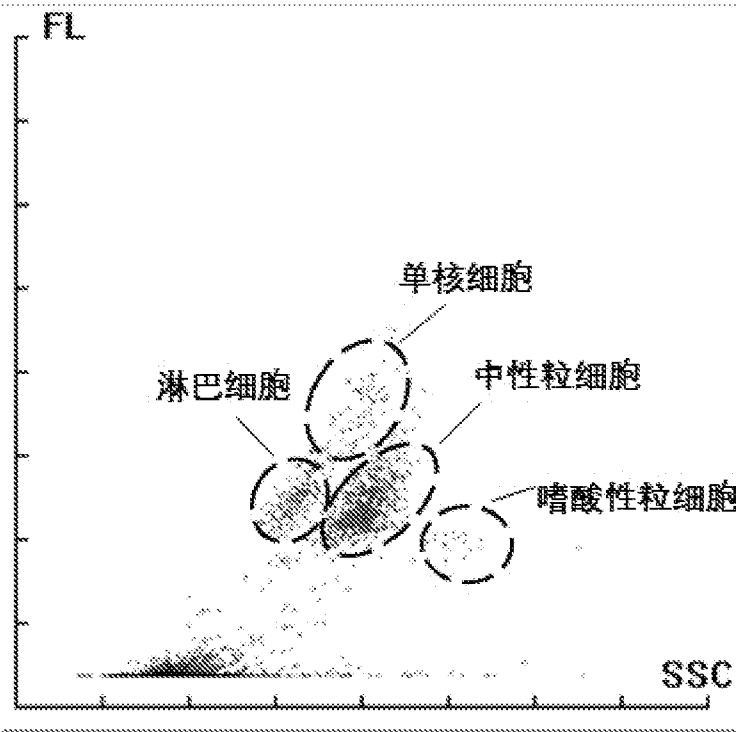


图 9

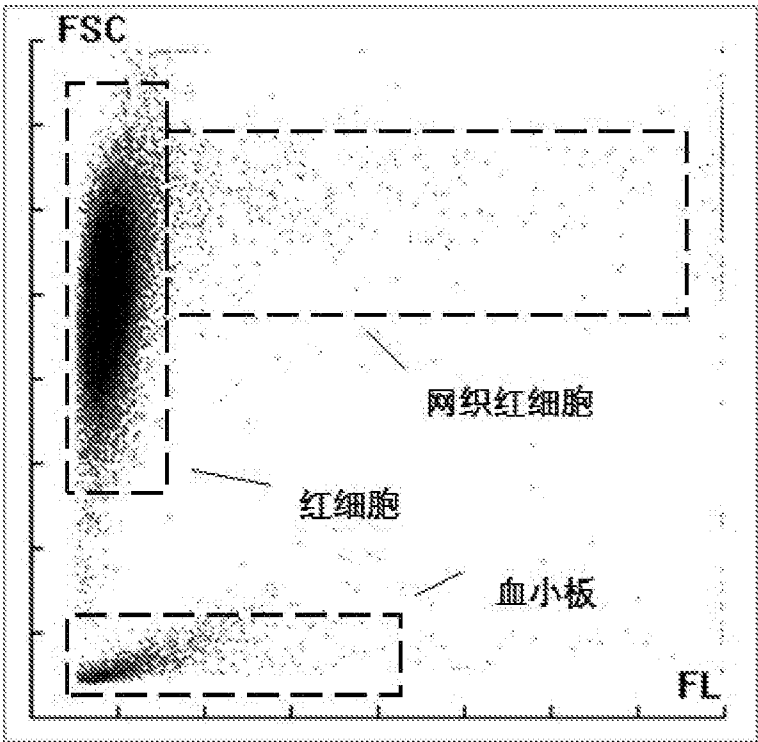


图 10

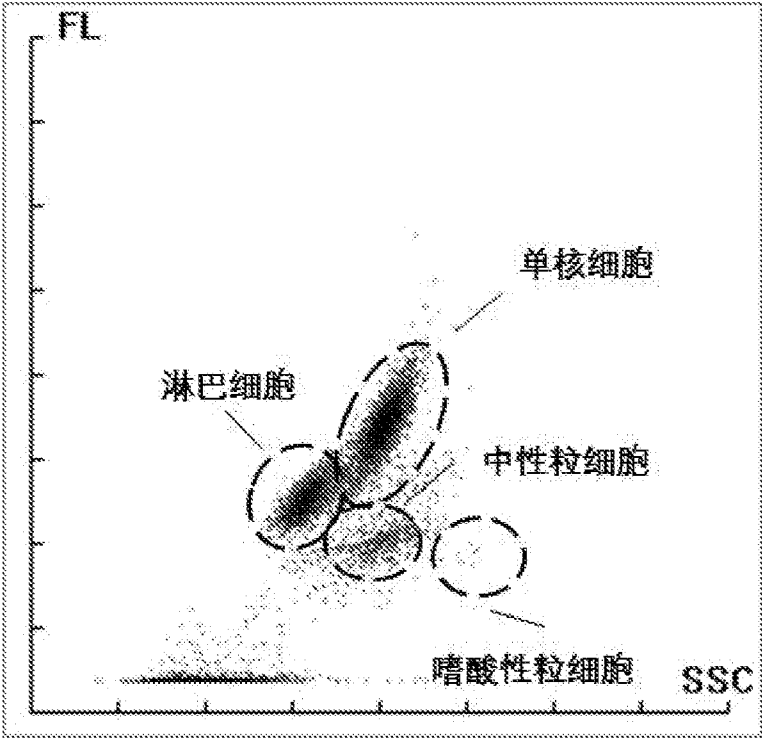


图 11

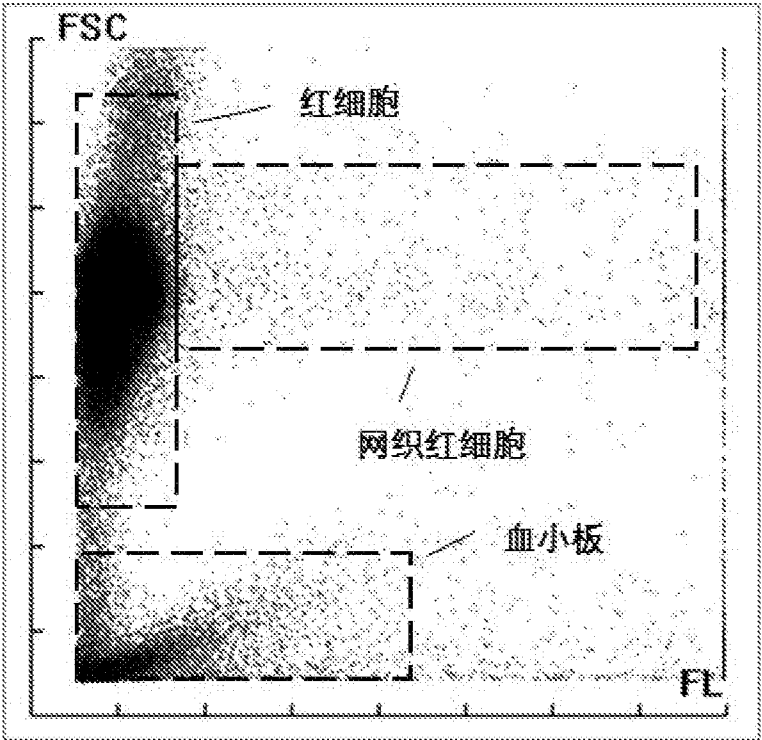


图 12

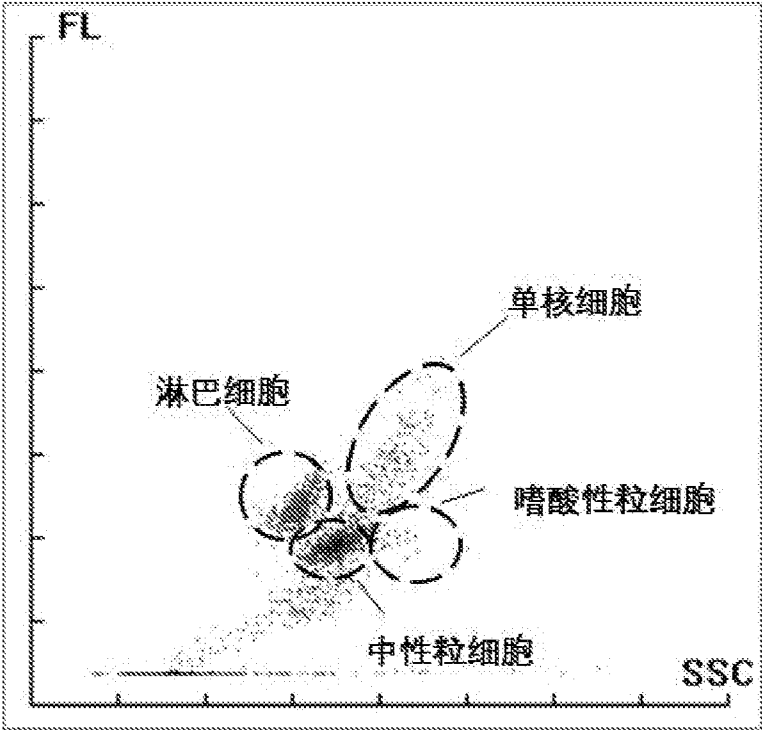


图 13

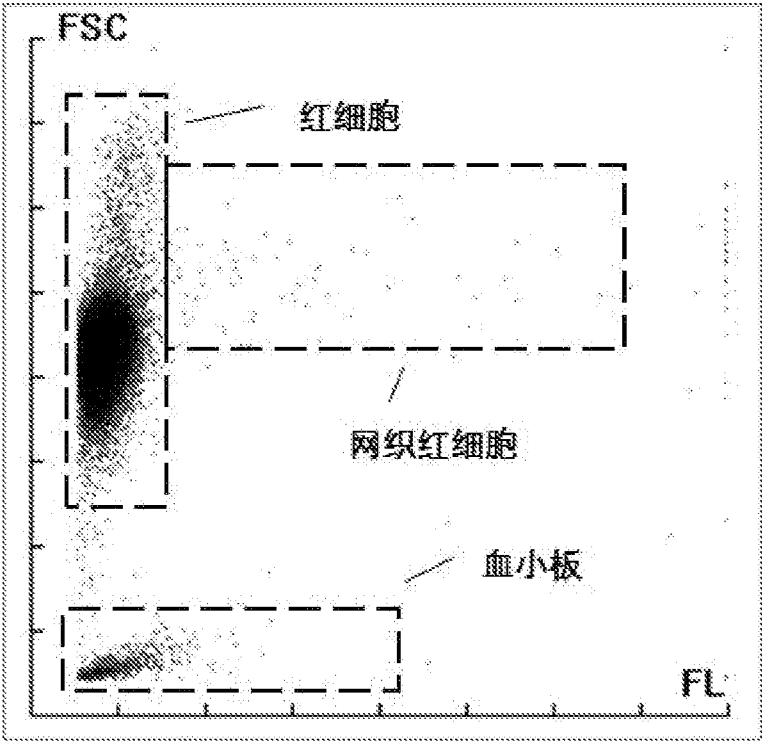


图 14

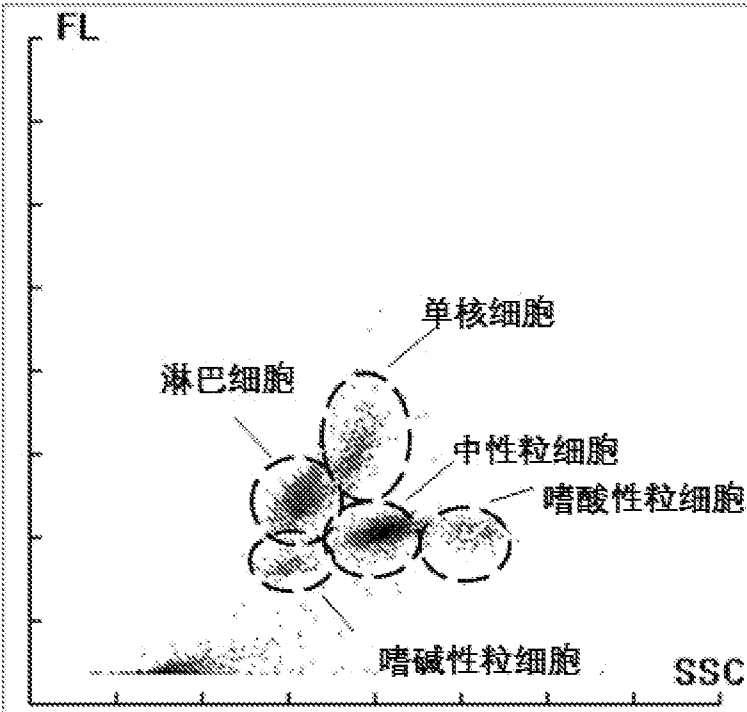


图 15

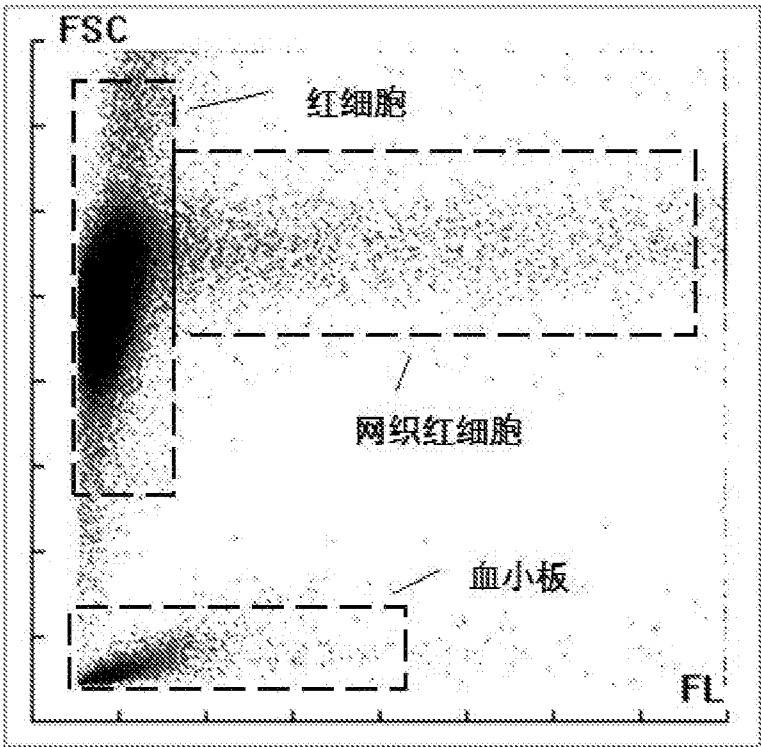


图 16

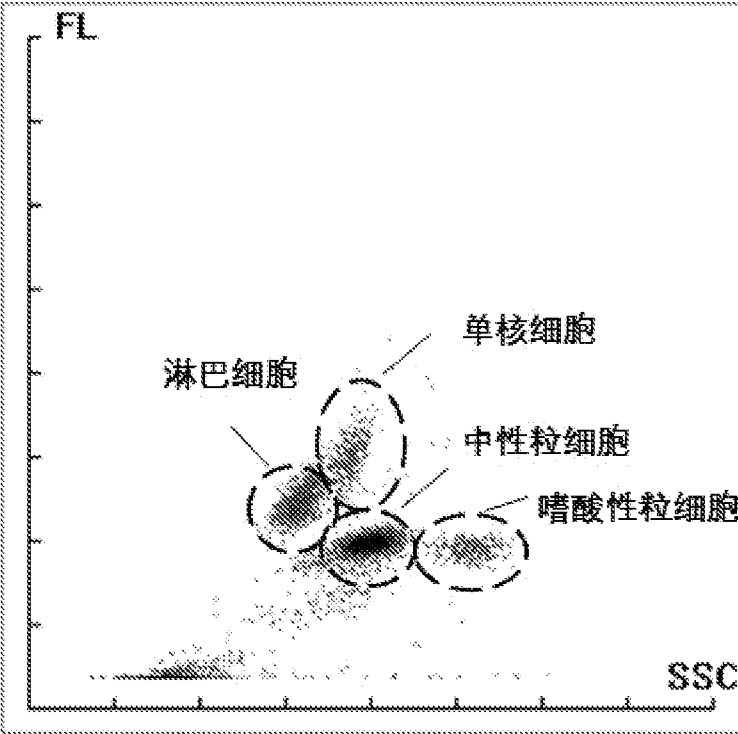


图 17

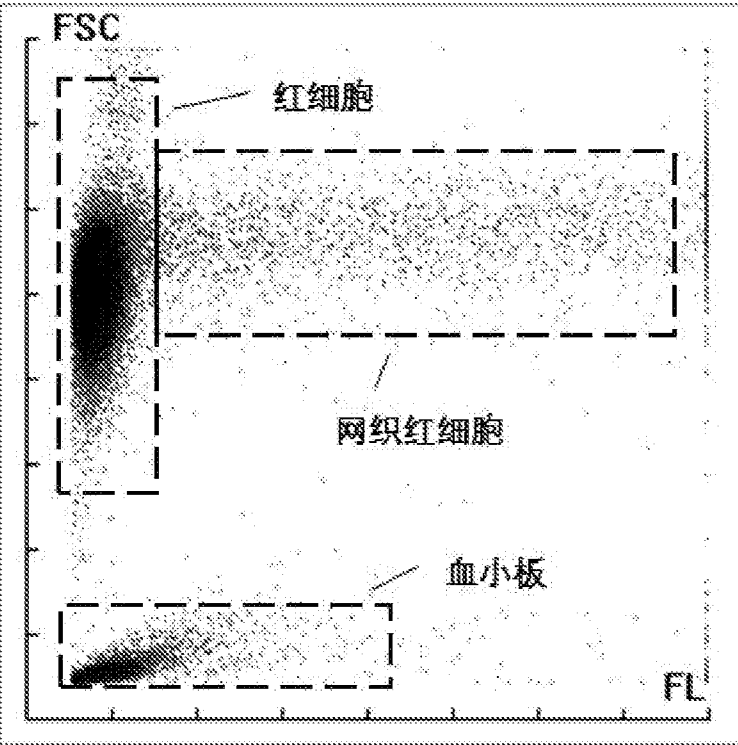


图 18

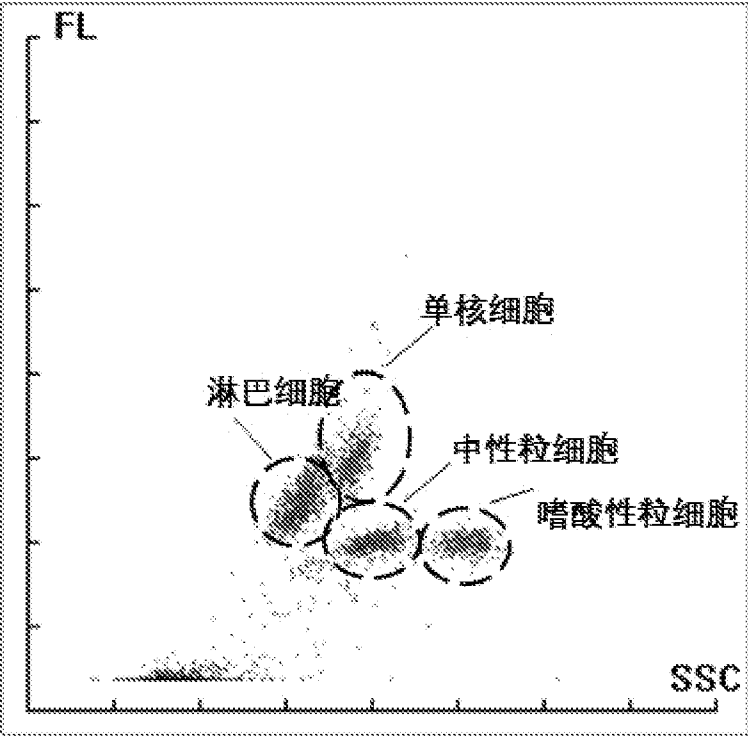


图 19

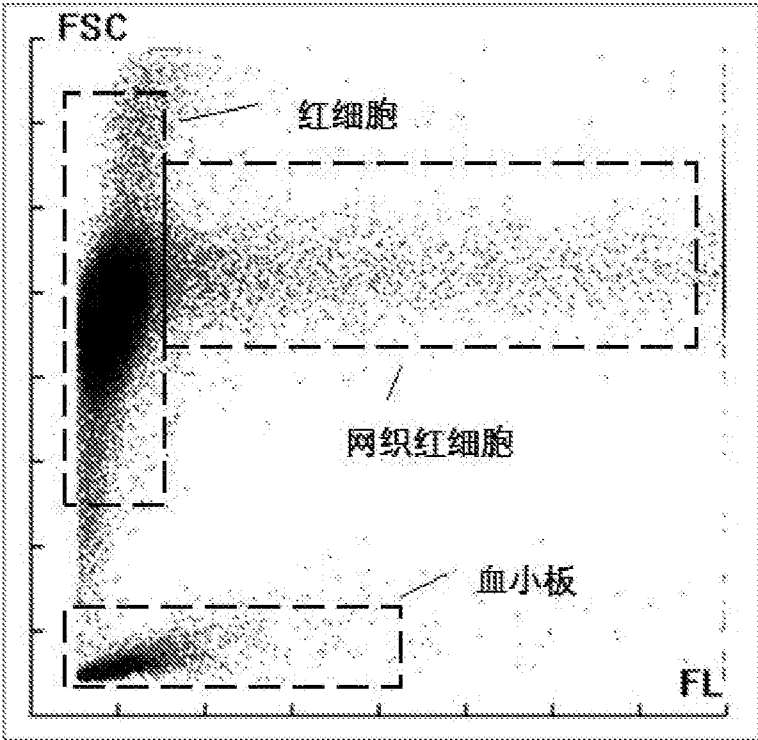


图 20

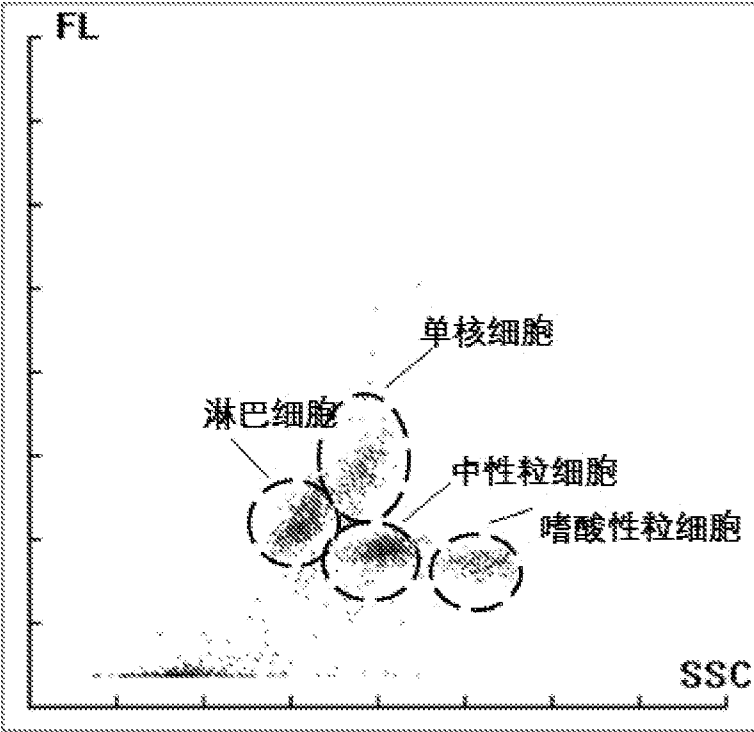


图 21

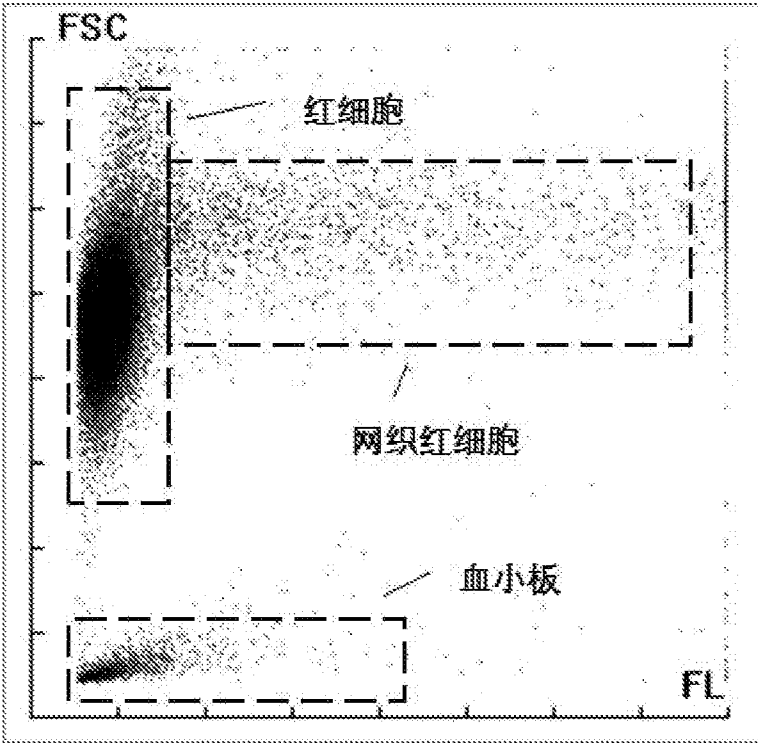


图 22

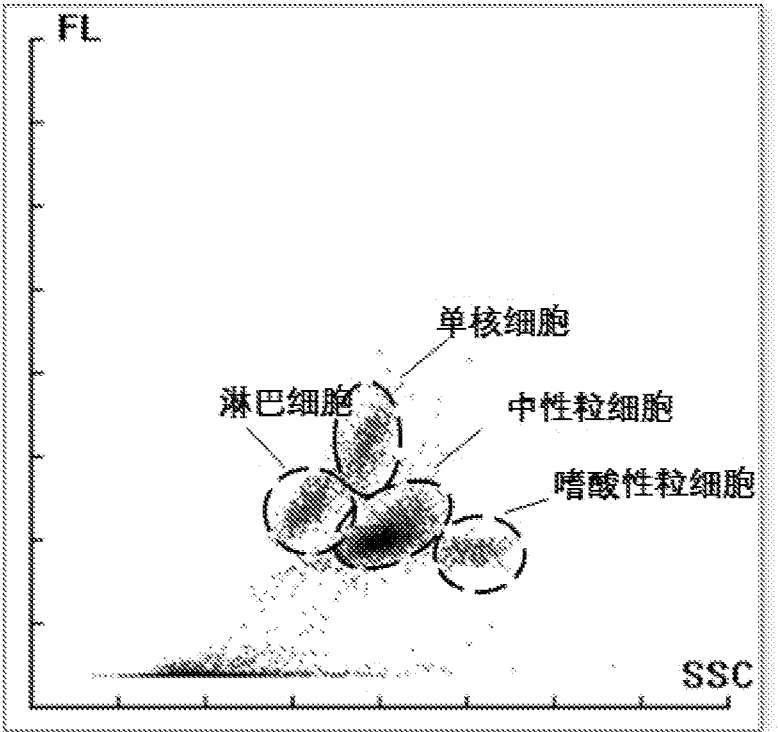


图 23

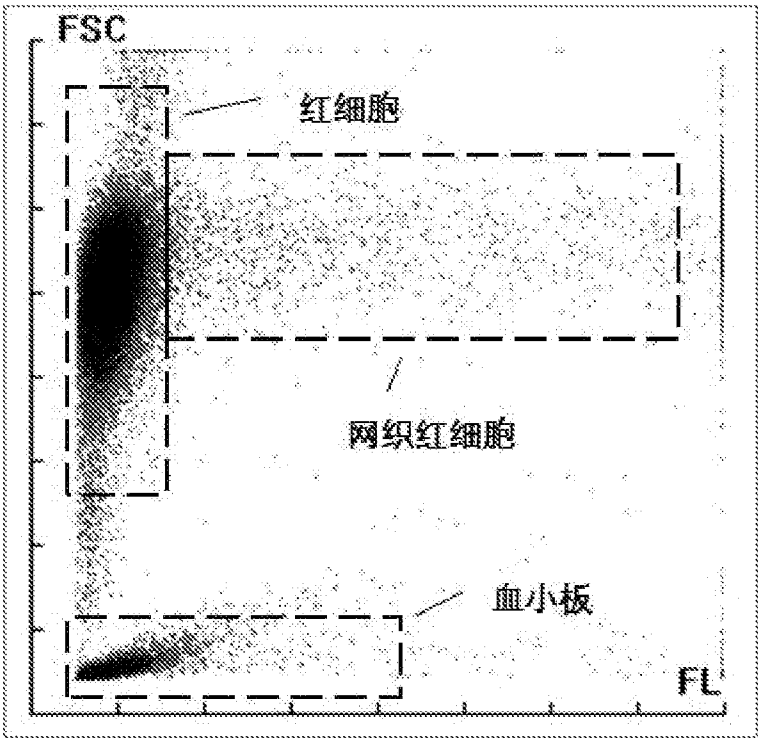


图 24

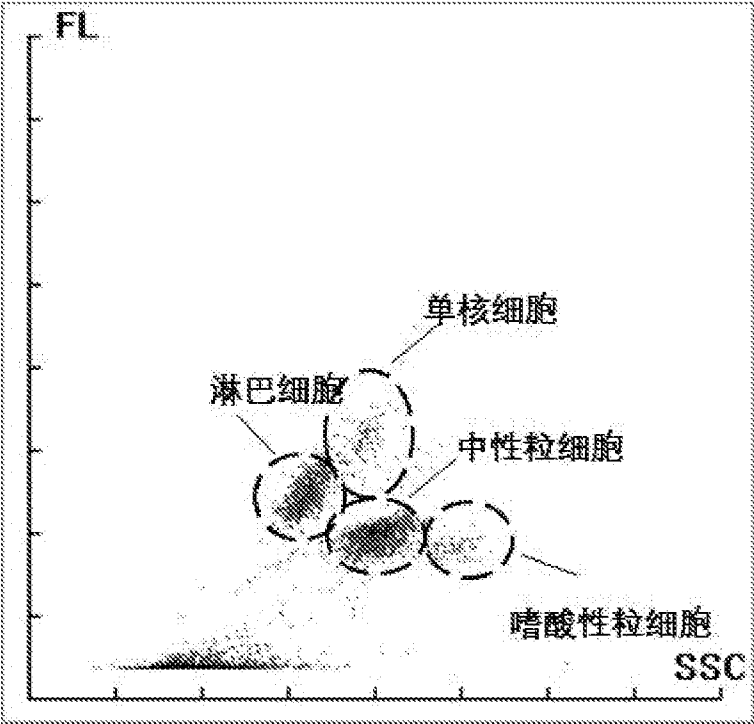


图 25

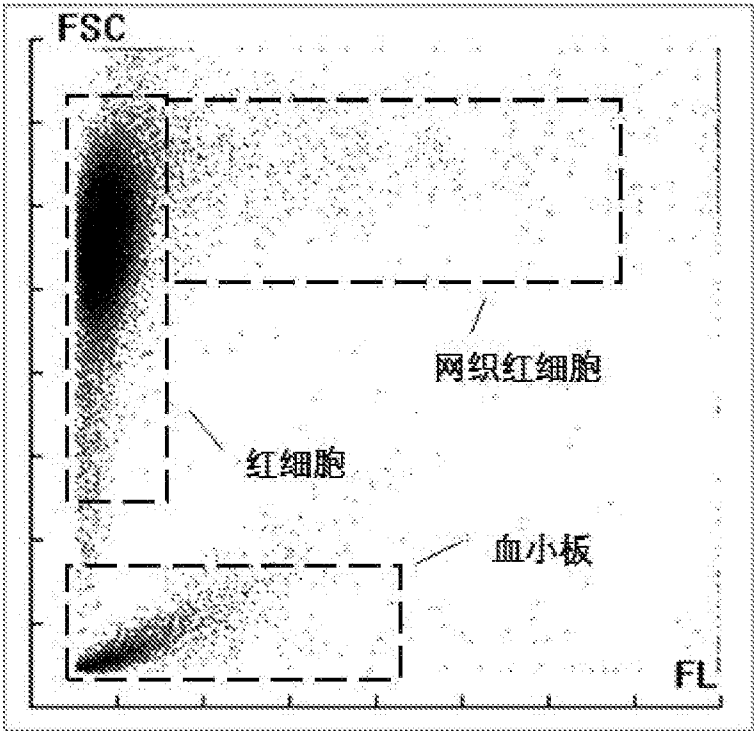


图 26

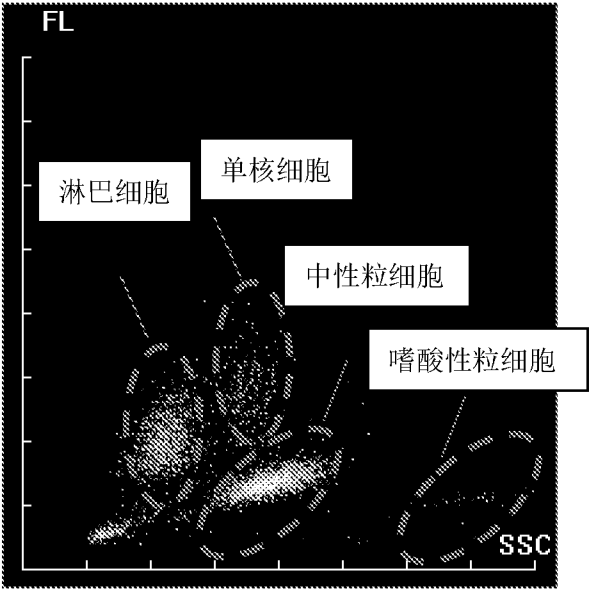


图 27

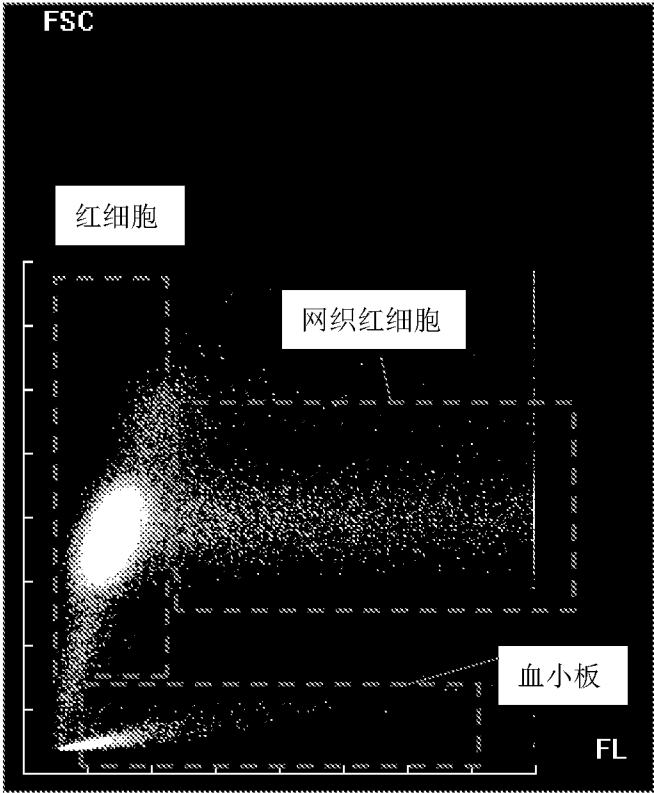


图 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/130478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C09B 23/10(2006.01)i; C07D 417/06(2006.01)i; C07D 513/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C09B; C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, PUBMED: 大连理工大学, 迈瑞, 樊江莉, 陈庚文, 夏天平, 叶燧, 张子千, 姚起超, 白细胞, 红细胞, 分类, 核酸, 荧光, 染色, 染料, 苯并噻唑, 吡啶, white blood cell?, WBC?, leu?ocyte?, red blood cell?, erythrocyte?, classif+, distinguish+, differen+, sort+, nucleic acid?, DNA?, RNA?, fluorescen+, dye+, benzothiazole, pyridine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5863753 A (MOLECULAR PROBES, INC.) 26 January 1999 (1999-01-26) description, columns 2-5	1-25
X	US 2004044219 A1 (SANDSTROM, Jennie et al.) 04 March 2004 (2004-03-04) description, paragraphs [0014]-[0032], and figures 1-4	1-25
X	US 5734058 A (BIOMETRIC IMAGING, INC.) 31 March 1998 (1998-03-31) description columns 1-8, table 1	1-25
A	CN 103804370 A (NANJING BOXUAN BIOLOGICAL SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD.) 21 May 2014 (2014-05-21) entire document	1-25
A	CN 111349091 A (BEIJING FLUORESCENCE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 30 June 2020 (2020-06-30) entire document	1-25
A	CN 109503550 A (JIANGXI NORMAL UNIVERSITY) 22 March 2019 (2019-03-22) entire document	1-25
A	CN 101680879 A (SYSMEX CORPRATION) 24 March 2010 (2010-03-24) entire document	1-25



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2022

Date of mailing of the international search report

25 January 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/130478

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1114422 A (TOA MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.) 03 January 1996 (1996-01-03) entire document	1-25
A	US 2020040190 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 06 February 2020 (2020-02-06) entire document	1-25
A	WO 9642015 A2 (COULTER INTERNATIONAL CORP.) 27 December 1996 (1996-12-27) entire document	1-25
A	US 2006223076 A1 (ANASPEC, INC.) 05 October 2006 (2006-10-05) entire document	1-25
A	WO 9905523 A1 (COULTER INTERNATIONAL CORP.) 04 February 1999 (1999-02-04) entire document	1-25
A	WO 0194473 A1 (LIGHTUP TECHNOLOGIES AB. et al.) 13 December 2001 (2001-12-13) entire document	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/130478

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	5863753	A	26 January 1999	CA	2179284	A1	09 May 1996
				CA	2179284	C	04 April 2006
				AU	1999039672	A1	20 January 2000
				US	5658751	A	19 August 1997
				EP	0740689	A1	06 November 1996
				EP	0740689	B1	30 January 2002
				DE	69525239	D1	14 March 2002
				DE	69525239	T2	27 June 2002
				JP	2009280820	A	03 December 2009
				JP	4634514	B2	23 February 2011
				WO	9613552	A2	09 May 1996
				JP	2007291403	A	08 November 2007
				JP	4503047	B2	14 July 2010
				AT	212653	T	15 February 2002
				AU	3967295	A	23 May 1996
				AU	714890	B2	13 January 2000
				JP	H09507879	A	12 August 1997
US	2004044219	A1	04 March 2004	WO	0194473	A1	13 December 2001
				SE	200002166	A	08 December 2001
				AU	6449301	A	17 December 2001
				SE	519172	C2	21 January 2003
				EP	1287077	A1	05 March 2003
				EP	1287077	B1	11 February 2004
				DE	60102014	D1	18 March 2004
US	5734058	A	31 March 1998	AU	1117797	A	29 May 1997
				WO	9717076	A1	15 May 1997
CN	103804370	A	21 May 2014	CN	104610773	A	13 May 2015
CN	111349091	A	30 June 2020	None			
CN	109503550	A	22 March 2019	None			
CN	101680879	A	24 March 2010	US	2010184061	A1	22 July 2010
				US	8455209	B2	04 June 2013
				RU	2010102038	A	27 July 2011
				RU	2435164	C2	27 November 2011
				PL	2166353	T3	31 January 2019
				MX	2009012997	A	30 March 2010
				BR	0211799	B1	13 November 2012
				BR	0011799	B1	20 December 2016
				CN	101680879	B	21 May 2014
				KR	20100032853	A	26 March 2010
				KR	101331332	B1	20 November 2013
				JP	WO2009001868	A1	26 August 2010
				JP	4981907	B2	25 July 2012
				WO	2009001868	A1	31 December 2008
				HU	E040270	T2	28 February 2019
				ES	2684695	T3	04 October 2018
				BR	PI0811799	A2	21 October 2014
				BR	PI0811799	B1	23 February 2021
				BR	PI0811799	B8	15 June 2021
				BR	PI0811799	C1	27 July 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/130478

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	1114422	A	03 January 1996	EP	2166353	A1	24 March 2010
				EP	2166353	B1	08 August 2018
				IN	191KOLNP2010	A	31 October 2014
				IN	274177	B	15 July 2016
				MX	312583	B	23 August 2013
				ID	500110	A	14 January 2010
CN	1114422	A	03 January 1996	CA	2147337	A1	22 October 1995
				CA	2147337	C	12 October 2004
				CN	1084474	C	08 May 2002
				TW	367409	B	21 August 1999
				AU	1657795	A	02 November 1995
				AU	685232	B2	15 January 1998
				US	5538893	A	23 July 1996
				EP	0678743	A1	25 October 1995
				EP	0678743	B1	04 July 2001
				DE	69521552	D1	09 August 2001
				DE	69521552	T2	31 October 2001
				JP	H07294518	A	10 November 1995
				JP	3467310	B2	17 November 2003
US	2020040190	A1	06 February 2020	KR	20200015119	A	12 February 2020
				KR	102114160	B1	22 May 2020
WO	9642015	A2	27 December 1996	JP	H11507733	A	06 July 1999
				JP	3679127	B2	03 August 2005
				US	5686308	A	11 November 1997
				DE	69603491	D1	02 September 1999
				DE	69603491	T2	17 February 2000
				EP	0846264	A2	10 June 1998
				EP	0846264	B1	28 July 1999
US	2006223076	A1	05 October 2006	US	2012123109	A1	17 May 2012
				US	8426618	B2	23 April 2013
				US	2014031524	A1	30 January 2014
				US	9006469	B2	14 April 2015
				US	2010331543	A1	30 December 2010
				US	8093411	B2	10 January 2012
				US	7910753	B2	22 March 2011
WO	9905523	A1	04 February 1999	JP	2001511525	A	14 August 2001
				EP	1000355	A1	17 May 2000
				US	5882933	A	16 March 1999
WO	0194473	A1	13 December 2001	AU	6449301	A	17 December 2001
				EP	1287077	A1	05 March 2003
				EP	1287077	B1	11 February 2004
				DE	60102014	D1	18 March 2004
				DE	60102014	T2	23 December 2004
				SE	0002166	D0	07 June 2000
				SE	0002166	L	08 December 2001
				SE	519172	C2	21 January 2003
				AT	259398	T	15 February 2004
				US	2004044219	A1	04 March 2004

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/130478

A. 主题的分类

C09B 23/10(2006.01)i; C07D 417/06(2006.01)i; C07D 513/04(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C09B; C07D

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, EPDOC, PUBMED: 大连理工大学, 迈瑞, 樊江莉, 陈庚文, 夏天平, 叶隼, 张子千, 姚起超, 白细胞, 红细胞, 分类, 核酸, 荧光, 染色, 染料, 苯并噻唑, 吡啶, white blood cell?, WBC?, leu?ocyte?, red blood cell?, erythrocyte?, classif+, distinguish+, differen+, sort+, nucleic acid?, DNA?, RNA?, fluo-rescen+, dye+, benzothiazole, pyridine

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US 5863753 A (MOLECULAR PROBES, INC.) 1999年1月26日 (1999 - 01 - 26) 说明书第2-5栏	1-25
X	US 2004044219 A1 (SANDSTROM, Jennie 等) 2004年3月4日 (2004 - 03 - 04) 说明书[0014]-[0032]段, 附图1-4	1-25
X	US 5734058 A (BIOMETRIC IMAGING, INC.) 1998年3月31日 (1998 - 03 - 31) 说明书第1-8栏, 表1	1-25
A	CN 103804370 A (南京博炫生物科技有限公司) 2014年5月21日 (2014 - 05 - 21) 全文	1-25
A	CN 111349091 A (北京富百科生物技术有限公司) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 全文	1-25
A	CN 109503550 A (江西师范大学) 2019年3月22日 (2019 - 03 - 22) 全文	1-25
A	CN 101680879 A (希森美康株式会社) 2010年3月24日 (2010 - 03 - 24) 全文	1-25

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年1月12日

国际检索报告邮寄日期

2022年1月25日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

苗君叶

电话号码 86-(10)-53962365

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1114422 A (东亚医用电子株式会社) 1996年1月3日 (1996 - 01 - 03) 全文	1-25
A	US 2020040190 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2020年2月6日 (2020 - 02 - 06) 全文	1-25
A	W0 9642015 A2 (COULTER INTERNATIONAL CORP.) 1996年12月27日 (1996 - 12 - 27) 全文	1-25
A	US 2006223076 A1 (ANASPEC, INC.) 2006年10月5日 (2006 - 10 - 05) 全文	1-25
A	W0 9905523 A1 (COULTER INTERNATIONAL CORP.) 1999年2月4日 (1999 - 02 - 04) 全文	1-25
A	W0 0194473 A1 (LIGHTUP TECHNOLOGIES AB. 等) 2001年12月13日 (2001 - 12 - 13) 全文	1-25

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/130478

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	5863753	A	1999年1月26日	CA	2179284	A1	1996年5月9日
				CA	2179284	C	2006年4月4日
				AU	1999039672	A1	2000年1月20日
				US	5658751	A	1997年8月19日
				EP	0740689	A1	1996年11月6日
				EP	0740689	B1	2002年1月30日
				DE	69525239	D1	2002年3月14日
				DE	69525239	T2	2002年6月27日
				JP	2009280820	A	2009年12月3日
				JP	4634514	B2	2011年2月23日
				WO	9613552	A2	1996年5月9日
				JP	2007291403	A	2007年11月8日
				JP	4503047	B2	2010年7月14日
				AT	212653	T	2002年2月15日
				AU	3967295	A	1996年5月23日
				AU	714890	B2	2000年1月13日
				JP	H09507879	A	1997年8月12日
US	2004044219	A1	2004年3月4日	WO	0194473	A1	2001年12月13日
				SE	200002166	A	2001年12月8日
				AU	6449301	A	2001年12月17日
				SE	519172	C2	2003年1月21日
				EP	1287077	A1	2003年3月5日
				EP	1287077	B1	2004年2月11日
US	5734058	A	1998年3月31日	DE	60102014	D1	2004年3月18日
				AU	1117797	A	1997年5月29日
CN	103804370	A	2014年5月21日	WO	9717076	A1	1997年5月15日
				CN	104610773	A	2015年5月13日
CN	111349091	A	2020年6月30日	无			
CN	109503550	A	2019年3月22日	无			
CN	101680879	A	2010年3月24日	US	2010184061	A1	2010年7月22日
				US	8455209	B2	2013年6月4日
				RU	2010102038	A	2011年7月27日
				RU	2435164	C2	2011年11月27日
				PL	2166353	T3	2019年1月31日
				MX	2009012997	A	2010年3月30日
				BR	0211799	B1	2012年11月13日
				BR	0011799	B1	2016年12月20日
				CN	101680879	B	2014年5月21日
				KR	20100032853	A	2010年3月26日
				KR	101331332	B1	2013年11月20日
				JP	W02009001868	A1	2010年8月26日
				JP	4981907	B2	2012年7月25日
				WO	2009001868	A1	2008年12月31日
				HU	E040270	T2	2019年2月28日
				ES	2684695	T3	2018年10月4日
				BR	PI0811799	A2	2014年10月21日
				BR	PI0811799	B1	2021年2月23日
				BR	PI0811799	B8	2021年6月15日
				BR	PI0811799	C1	2021年7月27日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/130478

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	公布日 (年/月/日)
				EP	2166353	A1	2010年3月24日
				EP	2166353	B1	2018年8月8日
				IN	191K0LNP2010	A	2014年10月31日
				IN	274177	B	2016年7月15日
				MX	312583	B	2013年8月23日
				ID	500110	A	2010年1月14日
CN	1114422	A	1996年1月3日	CA	2147337	A1	1995年10月22日
				CA	2147337	C	2004年10月12日
				CN	1084474	C	2002年5月8日
				TW	367409	B	1999年8月21日
				AU	1657795	A	1995年11月2日
				AU	685232	B2	1998年1月15日
				US	5538893	A	1996年7月23日
				EP	0678743	A1	1995年10月25日
				EP	0678743	B1	2001年7月4日
				DE	69521552	D1	2001年8月9日
				DE	69521552	T2	2001年10月31日
				JP	H07294518	A	1995年11月10日
				JP	3467310	B2	2003年11月17日
US	2020040190	A1	2020年2月6日	KR	20200015119	A	2020年2月12日
				KR	102114160	B1	2020年5月22日
WO	9642015	A2	1996年12月27日	JP	H11507733	A	1999年7月6日
				JP	3679127	B2	2005年8月3日
				US	5686308	A	1997年11月11日
				DE	69603491	D1	1999年9月2日
				DE	69603491	T2	2000年2月17日
				EP	0846264	A2	1998年6月10日
				EP	0846264	B1	1999年7月28日
US	2006223076	A1	2006年10月5日	US	2012123109	A1	2012年5月17日
				US	8426618	B2	2013年4月23日
				US	2014031524	A1	2014年1月30日
				US	9006469	B2	2015年4月14日
				US	2010331543	A1	2010年12月30日
				US	8093411	B2	2012年1月10日
				US	7910753	B2	2011年3月22日
WO	9905523	A1	1999年2月4日	JP	2001511525	A	2001年8月14日
				EP	1000355	A1	2000年5月17日
				US	5882933	A	1999年3月16日
WO	0194473	A1	2001年12月13日	AU	6449301	A	2001年12月17日
				EP	1287077	A1	2003年3月5日
				EP	1287077	B1	2004年2月11日
				DE	60102014	D1	2004年3月18日
				DE	60102014	T2	2004年12月23日
				SE	0002166	D0	2000年6月7日
				SE	0002166	L	2001年12月8日
				SE	519172	C2	2003年1月21日
				AT	259398	T	2004年2月15日
				US	2004044219	A1	2004年3月4日