

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 31/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02814528.3

[45] 授权公告日 2006 年 9 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1276252C

[22] 申请日 2002.7.25 [21] 申请号 02814528.3
[30] 优先权
[32] 2001. 7.27 [33] US [31] 09/917,533
[32] 2002. 6. 7 [33] US [31] 10/165,699
[86] 国际申请 PCT/US2002/023656 2002.7.25
[87] 国际公布 WO2003/012429 英 2003.2.13
[85] 进入国家阶段日期 2004.1.19
[71] 专利权人 贝克曼库尔特有限公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 李 毅 李 晶 特德·W·布林顿
审查员 飞竹玲

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司
代理人 丁香兰

权利要求书 4 页 说明书 15 页 附图 8 页

[54] 发明名称

有核红细胞的测量方法

[57] 摘要

本发明涉及一种鉴别和计数血样中的有核红细胞的方法。所述方法包括以下步骤：使用溶解剂溶解血样中的红细胞，在非聚焦血流孔中通过 DC 阻抗法测量有核血细胞，区分有核红细胞和其他细胞类型，以及报告血样中的有核红细胞。所述方法还包括从剩余血细胞计数中减去有核红细胞和其他干扰物质，并报告血样的校正的白细胞计数。此外，所述方法还包括在预先设定的波长下测量样品混合物的分光光度吸收值并报告血样中的血红蛋白浓度，所述波长为溶解血样后形成的血红蛋白白色原的波长。

1. 一种区分血样中有核红细胞和其他细胞类型的方法，该方法包括以下步骤：

- 5 (a) 将血样与溶解剂混合以溶解红细胞并形成血样混合物；
 (b) 使用非聚焦血流孔测量所述血样混合物的 DC 阻抗，得到所述血样混合物的血细胞分布；
 (c) 根据获得的血细胞分布区分有核红细胞和其他细胞类型；以及
 (d) 报告所述血样中的有核红细胞。

10 2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的报告有核红细胞的步骤包括报告所述血样中有核红细胞的存在。

 3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的报告有核红细胞的步骤包括报告相对于每 100 个白细胞的有核红细胞的数量。

15 4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的通过测量 DC 阻抗测定所述的血样混合物的步骤还包括计数所述血样混合物中的白细胞。

 5. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述的报告有核红细胞的步骤包括报告所述血样单位体积中有核红细胞的数量。

 6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述非聚焦血流孔的长宽比为 0.7 或 0.7 以上。

20 7. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述非聚焦血流孔的长宽比为 1.0 或 1.0 以上。

 8. 如权利要求 7 所述的方法，其中所述非聚焦血流孔的长宽比约为 1.2。

25 9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的将血样与溶解剂混合的步骤包括使用血液稀释剂稀释所述血样以形成稀释的血样，并混合所述的稀释血样与所述的溶解剂。

 10. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的将血样与溶解剂混合的步骤包括将所述的血样与含有盐的溶解剂混合以同时稀释并溶解所述血样。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 该方法还包括在预先设定的波长下测定所述血样混合物的分光光度吸收值并报告所述血样的血红蛋白浓度, 所述波长为溶解所述血样后形成的血红蛋白色原的波长。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中所述的血样混合物的吸收值在约
5 510 nm 和约 560 nm 之间测定。

13. 一种校正白细胞计数的方法, 该方法包括以下步骤:

(a) 将血样与溶解剂混合以溶解红细胞并形成血样混合物;

(b) 使用非聚焦血流孔测量所述血样混合物的 DC 阻抗, 得到血细胞分布以及剩余血细胞计数;

10 (c) 从获得的血细胞分布将有核红细胞和其他干扰物质与白细胞区分开;

(d) 从所述的剩余血细胞的计数中减去有核红细胞和其他干扰物质;

(e) 报告所述血样的校正白细胞计数。

15 14. 如权利要求 13 所述的方法, 该方法还包括报告所述血样中有核红细胞的存在。

15. 如权利要求 13 所述的方法, 该方法还包括报告所述血样中有核红细胞的数量。

16. 如权利要求 13 的方法, 其中所述的非聚焦血流孔的长宽比为 0.7
20 或 0.7 以上。

17. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述的非聚焦血流孔的长宽比为 1.0 或 1.0 以上。

18. 一种同时区分有核红细胞、计数白细胞并测量血样的血红蛋白浓度的方法, 该方法包括以下步骤:

25 (a) 将血样与溶解剂混合以溶解红细胞并形成血样混合物;

(b) 使用非聚焦血流孔测量血样混合物的 DC 阻抗, 得到血细胞分布以及剩余血细胞计数;

(c) 从获得的血细胞分布中将有核红细胞和其他干扰物质与白细胞区分开;

(d) 从所述的剩余血细胞计数中减去有核红细胞和其他干扰物质;
(e) 在预先设定的波长下测定所述血样混合物的分光光度吸收值,
该波长为溶解所述血样后形成的血红蛋白色原的波长;

- (f) 报告所述血样中有核红细胞;
5 (g) 报告所述血样中白细胞的数目; 并
(h) 报告所述血样的血红蛋白浓度。

19. 如权利要求 18 所述的方法, 其中所述的非聚焦血流孔的长宽比
为 0.7 或 0.7 以上。

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其中所述的非聚焦血流孔的长宽比
10 为 1.0 或 1.0 以上。

21. 如权利要求 18 所述的方法, 其中所述的将血样与溶解剂混合的
步骤包括使用血液稀释剂稀释所述血样以形成稀释的血样, 并混合所述
稀释血样和所述溶解剂。

22. 如权利要求 18 所述的方法, 其中所述的将血样与溶解剂混合的
15 步骤包括将所述血样与含有盐的溶解剂混合, 以同时稀释并溶解所述的
血样。

23. 如权利要求 18 所述的方法, 其中所述血样混合物的吸收值在约
510 nm 和约 560 nm 之间测定。

24. 一种分析血样中有核血细胞的方法, 该方法包括以下步骤:
20 (a) 将血样与溶解剂混合以溶解红细胞并形成血样混合物;
(b) 使用非聚焦血流孔测量所述血样混合物的 DC 阻抗, 得到所述
血样混合物的血细胞分布和更好的细胞类型分离, 所述非聚焦血流
孔的长宽比为 1.2 或 1.2 以上;
(c) 使用步骤 (b) 中获得的血细胞分布区分有核血细胞; 及
25 (d) 报告所述血样中有核血细胞的亚群。

25. 如权利要求 24 所述的方法, 其中所述有核血细胞亚群包括有核
红细胞和白细胞。

26. 如权利要求 24 所述的方法, 其中所述的有核血细胞亚群包括白
细胞亚群。

27. 如权利要求 24 所述的方法，其中所述的将血样与溶解剂混合的步骤包括使用血液稀释剂稀释所述血样以形成稀释的血样，并混合所述稀释血样和溶解剂。

28. 如权利要求 24 所述的方法，其中所述的将血样与溶解剂混合的
5 步骤包括将所述血样与含有盐的溶解剂混合，以同时稀释并溶解所述的血样。

29. 如权利要求 24 所述的方法，该方法还包括在预先设定的波长下测定所述血样混合物的分光光度吸收值以及报告所述血样中血红蛋白的浓度，所述波长为溶解所述血样后形成的血红蛋白色原的波长。

有核红细胞的测量方法

5 技术领域

本发明涉及一种鉴定血样中的有核红细胞的方法。更具体地，本发明通过非聚焦血流孔中测量直流电的阻抗，将有核红细胞与其他细胞类型区分开，并计数血样中的有核红细胞。

10 背景技术

正常的外周血中含有无核的成熟红细胞。有核红细胞（NRBCs）或成熟红细胞为未成熟的红细胞。它们通常出现在骨髓中而不出现于外周血中。然而在特定的疾病中，如贫血和白血病，NRBCs 也见于外周血中。因此，测量 NRBCs 具有临床重要性。传统上，鉴别和计数 NRBC 均由人工进行。

15 该过程包括将血样制成显微镜下可观察的涂片，并对其染色，然后对每张涂片进行人工可见分析。NRBC 的浓度报告为每 100 个白细胞的 NRBC 数量。一般地，计数存在 200 个白细胞的血样涂片的同一区域中的 NRBC 数量，并将该数量除以 2 以表示 NRBC 的浓度，即 NRBC 数量/100 WBC。该方法极费时，且依赖于涂片的检验员的主观分析。

20 近年来，出现了一些鉴别 NRBCs 的荧光流式细胞计的方法。因为这些方法难以依靠细胞的电学或光学性质鉴别 NRBC，所以要使用特定的核染色技术将 NRBCs 与其他细胞类型区分开。

美国专利号 5,298,426（授予 Inami 等）公开了一种鉴别 NRBCs 的荧光法。该方法使用一号液和二号液进行两步染色。Inami 等教导，一号液
25 含有一种成红细胞染料，其可渗透入有核红细胞内，特异地对其核进行染色，然后将 NRBCs 群体与其他细胞群体区分开，以二维图的方式显示经计算机处理 NRBC 鉴别结果。

美国专利号 5,559,037（授予 Kim 等）公开了一种可用于 NRBCs 和白细胞的流式细胞计数分析法。该方法包括溶解全血样中的红细胞和 NRBC

的胞质，以便将 NRBC 的核暴露于活体核染剂中，并将该染剂对白细胞的渗透率降到最低，通过测量荧光强度和两个光散射角分析样品。该方法代表了一种三重激发法，该三重激发法阻止细胞碎片中的信号（荧光的和非荧光的），并将位于 ALL 激发信号以下，但在荧光激发信号（FL3）
5 以上的信号定为 NRBCs。ALL 是轴向光损失或在入射光的角度为零时检测到的光散射信号。因此，该方法需要一维以上的预选通信号来鉴别 NRBC 群体。此外，该方法还需要将反应物加热至 42℃ 以便区分 NRBC 与白细胞。

美国专利号 5,648,225（授予 Kim 等）公开了一种使用多用溶解剂鉴别有核血细胞亚型的方法。该方法包括以下步骤：使用含有核染料的多
10 用溶解剂溶解血样，在较高温度下对样品混合物进行孵育，并使用自动光电血液仪对有核血细胞包括 NRBCs 进行鉴定。

美国专利号 5,879,900（授予 Kim 等）公开了一种使用流式细胞计鉴别血样中 NRBCs、破坏的白细胞（WBC）、WBC 以及白细胞分类的方法。该方法包括以下步骤：溶解血样；使用活体核染剂对 NRBCs 和任何破坏的
15 白细胞进行染色；通过测量至少一个荧光强度值和在 0 度至 1 度和 3 度至 10 度的范围内的至少一个光散射信号，分析样品混合物；根据荧光强度和光散射信号建立三维图；并鉴别和计数 WBC、NRBC、破坏的 WBC 和 WBC 亚型分类。

EP1 004 880 A2 公开了鉴别和计数有核红细胞的试剂和方法。该方法
20 包括以下步骤：溶解红细胞，对白细胞和 NRBCs 进行染色，通过测量至少一个散射光参数和至少一个荧光强度参数分析样品。

美国专利号 5,874,310（授予 Li 等）公开了一种鉴别有核红细胞的方法。该方法包括以下步骤：溶解成熟红细胞；通过测量光散射强度分
析流槽中的样品来区分 NRBCs 和其他细胞类型。所述测量光散射强度使用
25 了两个小于 10 度的小角度光散射信号。该方法还包括通过电学和光学分析同时对白细胞进行鉴别，其中电学分析是指 DC 阻抗测量。

美国专利号 5,917,584（授予 Li 等）公开了一种鉴别有核红细胞的方法。该方法包括以下步骤：溶解血样中的成熟红细胞；通过测量两个光散射角度分析流槽中的样品以区分 NRBCs 和其他细胞类型，其中第二

个光散射信号是中角度或直角光散射信号。

以上描述的方法通过荧光流式细胞计数和光散射测量法对 NRBCs 和白细胞进行了鉴别和计数。然而，荧光和光散射测量是技术复杂、价格昂贵的检测方法。

- 5 现在许多非荧光自动血液分析仪，如 Abbott Cell-Dyn® 3500，COULTER® Gen*S™，Bayer Advia*120®和 Sysmex™ NE-9000，当仪器感受到获得的细胞分布图中的邻近血细胞碎片区域的信号数量增加时，只能提供 NRBC 可能存在于待分析血样中的 NRBC 标志信号。然而，这样的技术经常出现假阳性信号，因为许多其他血液疾病也可引起同区域内的信号
- 10 增加，如血小板凝集和镰刀形细胞，以及未完全溶解的血样中的红细胞碎片。在这些方法中，不能明确地鉴别出 NRBCs。可替代地，仪器只能识别分布图或点图中常见的 NRBC 样品分布模式，该模式可能与上述的其他原因产生的相似模式混淆。

- 进一步地，含有 NRBC 的样本的公知问题是血液分析仪报错样本中白
- 15 细胞的数目（WBC）。由于 NRBC 核的体积与白细胞的核的体积相近，测量血细胞大小的血液分析仪通常将其作为白细胞计数，致使 WBC 的数目增加。因此，对含有 NRBC 的样品需要校正 NRBC 部分对血液分析仪报告的 WBC 的影响。目前临床实验室的做法是从血液分析仪中报告的 WBC 计数中减去人工计数所得的 NRBC 数值。该过程既耗时又容易出错。

- 20 另一方面，测量血样中的血红蛋白（Hgb）浓度是血液分析的一个组成部分，这对于疾病的诊断和监控医疗反应有重要意义。使用同样的试剂并同时测量完成多重诊断分析是可取的，所述多重诊断分析包括血样中有核红细胞的计数和血红蛋白浓度的测定。

- 在许多公知的测定血红蛋白的方法中，国际血液学标准委员会
- 25 （International Committee for Standardization in Hematology）推荐氰化正铁血红蛋白法作为标准方法。但试剂废弃物中的氰化物会引起诸多环境问题。最近十年中，科学家们努力致力于开发不使用氰化物的自动血红蛋白分析法。

美国专利号 5, 242, 832（授予 Sakata）公开了一种使用不含氰化物的

溶解剂，计数白细胞和测定血样中的血红蛋白浓度。PCT/US95/02897（授予 Kim）公开了一种使用不含氰化物的方法和试剂测量全血样中的血红蛋白。Kim 未涉及白细胞计数也未涉及有核红细胞的鉴别。美国专利号 5,763,280 和 5,882,934（授予 Li 等）公开了一种不含氰化物的试剂，该
5 试剂用于测量血样中血红蛋白，计数白细胞和鉴别白细胞亚群。然而，上述的血红蛋白测量方法无一能将具有核红细胞从其他细胞类型中鉴别出来。

依上所述，需要一种简单而且价格较低的鉴别并计数有核红细胞的分析法。而且，期望一种能够在同一个检测中同时进行有核血细胞的计
10 数，区分有核红细胞和其他细胞类型，以及测量血红蛋白浓度的多功能检测法。

发明内容

在一个实施方式中，本发明涉及一种区分血样中有核红细胞和其他
15 细胞类型的方法。该方法包括以下步骤：将血样与溶解剂混合以溶解红细胞并形成血样混合物；在非聚焦血流孔内测量血样混合物的 DC 阻抗，并得到血样混合物的血细胞分布；区分有核红细胞和其他细胞类型；报告血样中的有核红细胞数量。该非聚焦血流孔的长宽比为 0.7 或 0.7 以上。报告有核红细胞包括报告血样中有核红细胞的存在，和报告血样中
20 相对于每 100 个白细胞的有核红细胞的数目，或单位体积血样中有核红细胞的数目。

在另一实施方式中，本发明涉及一种校正白细胞计数的方法。该方法包括以下步骤：将血样与溶解剂混合以溶解红细胞并形成血样混合物；
测量血样混合物的 DC 阻抗，以得到血细胞分布及剩余血细胞的计数；将
25 有核红细胞和其他干扰物质与白细胞区分开；从剩余血细胞计数中减去有核红细胞和其他干扰物质；及报告血样中校正的白细胞计数。该方法还包括报告血样中的有核红细胞。

在另一实施方式中，本发明涉及一种能够同时鉴别有核红细胞，计数白细胞并测量血样中血红蛋白浓度的方法。该方法包括以下步骤：将

血样与溶解剂混合以溶解红细胞并形成血样混合物；测量血样混合物的 DC 阻抗，以得到血细胞分布及剩余血细胞的计数；将有核红细胞和其他干扰物质与白细胞区分开；从剩余血细胞计数中减去有核红细胞和其他干扰物质；在预先设定的波长下测定所述血样混合物的分光光度吸收值，
5 该波长为溶解所述血样后形成的血红蛋白色原的波长；报告血样中的有核红细胞；报告血样中的白细胞数量；并报告血样的血红蛋白的浓度。

附图说明

图 1A, 1B 和 1C 分别是一种正常血样和两种含有有核红细胞的临床
10 上异常血样的 DC 分布图。这些样本根据实施例 1 所述的步骤进行处理，并使用非聚焦血流孔在试验血液分析仪上进行分析，孔的长为 120μ ，宽为 100μ 。

图 2A 和 2B 显示一种正常血样和一种含有有核红细胞的临床样品的分布图。该样品根据实施例 2 所述的步骤进行处理，并使用非聚焦血流
15 孔在试验血液分析仪上进行分析，孔的长为 70μ ，宽为 100μ 。

图 3A 和 3B 显示一种含有有核红细胞的临床样品的分布图，该样品根据实施例 1 所述的步骤进行处理，并使用非聚焦血流孔在两台试验血液分析仪上进行分析，孔的大小分别为长 120μ ，宽 100μ 和长 85μ ，宽
20 70μ 。

图 4A 显示一种全血样的分布图，该样本使用实施例 4 中的溶解剂组合物并经实施例 4 所述的步骤获得。图 4B 显示同种样品的谱图，该样品使用实施例 4 描述的溶解剂组合物并经实施例 4 所述的步骤处理。

图 5A 显示通过本发明实施例 5 描述的方法获得的 NRBC 浓度和人工参考值之间的相关性。图 5B 显示通过本发明实施例 5 描述的方法获得的
25 血红蛋白浓度与从 COULTER Gen*S 上所得的浓度之间的相关性。图 5C 显示通过本发明实施例 5 描述的方法获得的 WBC 校正值和 COULTER COULTER® ZBI 测得的并经人工 NRBC 计数法校正的 WBC 值之间的相关性。

图 6 显示本发明的一种分布图，该图用于区分有核红细胞和白细胞，并进一步鉴别白细胞的亚群，如淋巴和髓样亚群。

具体实施方式

本发明的一个实施方式涉及一种鉴别分析有核红细胞的方法。更具体地，该方法通过测量非聚焦血流孔中的直流电的阻抗，区分血样中的有核红细胞和其他细胞类型。

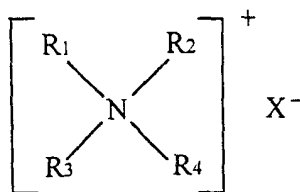
- 5 区分血样中的有核红细胞和其他细胞类型的方法包括如下步骤：将血样与溶解剂混合以溶解红细胞并形成血样混合物；在非聚焦血流孔中测量所述血样混合物的 DC 阻抗，并获得所述血样混合物的血细胞分布；区分有核红细胞（NRBCs）和其他细胞类型。

10 为了溶解血样，可以首先用血液稀释剂将血样稀释，然后与足量的溶解剂混合以溶解红细胞。为了本发明的目的，所述血液稀释剂含有足量的一种或多种盐以测量样品混合物的阻抗。适合的盐类的例子为碱金属盐。

血液分析仪通常使用血液稀释剂来稀释血样以测定红细胞，其中的血液稀释剂由盐调节至等渗以保持血细胞的体积。尽管鉴别分析 NRBCs 15 并不需要等渗条件，但为了本发明目的，使用市面上出售的等渗血液稀释剂是方便的。

适于与本发明中的血液稀释剂合用的溶解剂包含如下的水溶液：

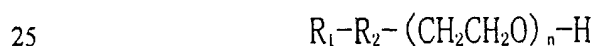
(a) 一种或多种季铵盐，其分子结构如下：



- 20 其中 R_1 为具有 12 至 16 个碳原子的烷基、烯基或炔基； R_2 ， R_3 和 R_4 为具有 1 至 4 个碳原子的烷基； X 为氯或溴阴离子；

(b) 乙氧基化烷基酚，其中烷基具有 6 至 12 个碳原子，环氧乙烷的数量在约 10 至约 50 之间；和

(c) 分子结构如下的乙氧基醇：



其中 R_1 为具有 10 至 22 个碳原子的烷基、烯基或炔基； R_2 为 $-O-$ ； n

在 20 和 35 之间。

合适的季铵盐的例子有：溴化十四烷基三甲基铵、溴化十六烷基三甲基铵和氯化十二烷基三甲基铵。乙氧基醇的适当例子有：新泽西州 BASF 公司的 Plurofac A38 prill 表面活性剂和新泽西州 Heterene 公司的
5 Hetoxol STA-30。乙氧基酚的适当例子有：新泽西州 Rhône-Poulenc 公司的 Igepal SS-837 和南卡罗来纳州 Chemax 公司的 Chemax NP-30。

可替换地，所述溶解剂还含有足量的用于测量阻抗的一种或多种盐，该溶解剂可在不另外使用血液稀释剂的条件下溶解血样。适当的盐类的例子为碱金属盐，如硫酸盐，氯化物，磷酸盐和柠檬酸盐。

10 对 NRBCs 的鉴别分析在非聚焦血流孔中使用 DC 阻抗测量法进行。当一个如血细胞这样的颗粒经过该孔时，可测量到由于传导性或阻抗的变化引起的电信号。所述脉冲的形状、高度和宽度直接与颗粒的大小相关，并可转换成所测量的微粒的大小。当测量两种或更多种不同大小的微粒时，所得的分布图即可表示微粒大小的分布。

15 用配备有 DC 阻抗测量仪器的血液分析仪检测血细胞数量和大小的方法在美国专利号 2,656,508（授予 Coulter）和美国专利号 3,810,011（授予 Coulter 等）中有大致描述，这里全部引入作为参考。

已发现孔的长宽比，即孔长与孔宽的比例，影响不同大小的血细胞的分离效果，尤其影响区分 NRBC 群体与其他有核血细胞。使用本发明的
20 方法，分离 NRBC 群体与其他类型的细胞可在长宽比为 0.7 或 0.7 以上的孔中进行。

已知孔的长宽比影响流经其中的血流曲线，进而影响颗粒在血流中的轨迹。通常，在孔的宽度固定的情况下，血流中心的流速随着孔长的增加而增加。因此，增加孔的长宽比可以增加流速梯度（与孔壁作用的
25 血流接触面流向血流中心方向）。在该流速梯度的影响下，通过孔的血流中的悬浮颗粒会向血流中心移动。因此，在这样的条件下，其中的微粒与通过聚焦血流孔的微粒的行为相似。聚焦血流孔可用于本发明中测量有核血细胞，尤其适于鉴别大小相似的血细胞。然而，聚焦血流孔的成本比非聚焦血流孔的成本要高得多。

另一方面，已知沿着孔的截面，所加电场在截面上的场强不同。由于每个颗粒在孔截面的位置不同，其所处的电场强度也不同，因此，通过非聚焦血流孔的颗粒可以产生不同的脉冲形状。这些脉冲的变形可引起测得的分布图中颗粒大小的分布变异。过去本领域广泛应用脉冲编辑来删除严重变形的脉冲，在一定程度上提高对颗粒大小的鉴别能力。应理解增加孔的长宽比后，沿着从中心至孔壁的方向截面的电场梯度递减。结果由于不经过孔中心的截面的电场更均匀，不经过该孔中心的颗粒产生的电脉冲其变形较小。

因此，增加孔的长宽比带来的两个效应，即控制非聚焦血流孔中颗粒的轨迹和沿孔的截面电场梯度的递减，可增强对不同大小的颗粒的鉴别能力。

已发现使用长宽比为 0.7 或 0.7 以上的非聚焦血流孔可以区分 NRBC 群体与其他大小相近的有核血细胞，尤其是淋巴细胞。优选地，使用长宽比为 1.0 或 1.0 以上的孔。更优选地，使用长宽比约为 1.2 的孔。

进一步增大孔的长宽比，可以更好地将 NRBC 从其他细胞类型中分离出来。然而，当孔的长宽比为 1.5 或更大时，对通过测量孔的样品混合物的处理能力显著降低，从而使得测量与血液测量仪的负荷能力不符。因此，应理解在细胞分离和测量负荷平衡的基础上，选用长宽比为 1.2 的孔最为实际。理论上，长宽比在 1.2 以上的孔可以用于分离 NRBCs 与其他类型细胞。

图 1A, 1B 和 1C 表示血样的 DC 分布图，该样品经本发明的方法按照实施例 1 所述的步骤处理，并使用非聚焦血流孔在试验血液分析仪上进行分析，孔的长为 120μ ，宽为 100μ 。孔的长宽比为 1.2。图 1A 是一张正常血样的分布图。如图所示，正常的血样经溶解剂溶解红细胞后，有核血细胞显示一种双重模式分布。在本发明中，所有的有核细胞均为白细胞。左峰的主要细胞群为淋巴细胞。在该峰的左侧，分布图区域很干净。

图 1B 和 1C 是两份含有有核红细胞的临床异常血样的分布图。图 1B 和 1C 所示的血样分别含有由人工参考法测定的 230 NRBC/100 WBC 和 9

NRBC/100 WBC。NRBC 群作为一个附加峰出现在白细胞的左侧。

图 2A 和 2B 分别表示正常血样和含有有核红细胞的临床血样的分布图，其中的样品经实施例 2 中的步骤处理，并使用非聚焦血流孔进行分析，该孔的长为 70μ ，宽为 100μ 。孔的长宽比为 0.7。试验血液分析仪与实施例 1 中使用的分析仪的信号放大比例不同。如图所示，NRBC 群体出现在白细胞的左侧。

图 3A 和 3B 表示含有有核红细胞的临床血样的分布图，该样品经实施例 1 所述的方法处理，并如实施例 3 所述，在两台试验血液分析仪上分析。图 3A 所示的分布图经非聚焦血流孔分析所得，孔的长为 120μ ，宽为 100μ 。图 3B 所示的分布图经非聚焦血流孔分析所得，孔的长为 85μ ，宽为 70μ 。尽管这两种类型的孔在长度和宽度上均不相同，但其长宽比均为 1.2。明显地，这两张分布图的类群分布相似。在这两例中，均可实现区分 NRBC 群体与其他类型的有核细胞。

使用本发明的方法，由于将 NRBC 群体从其他类型的细胞尤其是白细胞中鉴别出来，所以可以鉴别并报告出所分析样品中 NRBC 群体的存在。报告血样中临床异常的细胞群体的存在称为血液分析仪的标记，其是支持临床诊断的重要依据。

使用本发明的方法可以进一步计数 NRBC 群体。当将 DC 探测器的阈值设定在 NRBCs 的体积以下时（如图），可同时计数 NRBC 群体与白细胞。通过 DC 分布图中群体的分布将 NRBC 群体从其他细胞类型中鉴别出来后，即可计算出所分析血样中 NRBC 的浓度。NRBC 的浓度以每 100 个白细胞中 NRBC 的数量（NRBC/100 WBC）表示，与人工参考值的单位相同。可替换地，还可将比率乘以血样中的白细胞计数，以单位体积的血样中的绝对数值代表 NRBC 数量。

在另一实施方式中，本发明的方法还包括校正白细胞计数。过去白细胞数量是通过直接电阻法测定的，因为未将 NRBCs 与其他有核血细胞区分开，所以 NRBCs 的全部或部分也计算在内。NRBCs 的干扰可导致白细胞计数的结果增高和错误。本发明中的方法通过鉴别 NRBCs，可以从总有核血细胞数量中减去被计入白细胞计数中的 NRBCs 群体的数目。

此外，已知有些血样比正常血样难以溶解。有些情况下，如果在样品的准备过程中血细胞膜不能充分溶解，其大小不能降至 DC 探测阈值以下，细胞碎片也会影响白细胞计数。一般地，细胞碎片的体积相对较小，其出现于分布图中 NRBCs 的左侧。

- 5 然而，使用本发明的方法，通过提高了不同细胞类型的分离水平，能更好地分离白细胞和干扰物质，并从样品混合物的剩余血细胞总数中去除干扰物质的影响，因此，通过本方法可以报告得到校正的白细胞数值。

10 这里所述的术语干扰物质有广泛的含义，其包括任何非白细胞的颗粒物，但是其存在于血样混合物中，并在测量白细胞的过程中被 DC 阻抗测量仪计数在内。

在另一实施方式中，本发明还涉及一种同时鉴别有核红细胞并测量血样中血红蛋白浓度的方法。该方法包括以下步骤：(a) 将血样与溶解剂混合以溶解红细胞并形成血样混合物；(b) 在非聚焦血流孔中测量血样混合物的 DC 阻抗，并获得血样混合物的血细胞分布；(c) 区分有核红细胞与其他细胞类型；(d) 在预先设定的波长下测定血样混合物的分光光度吸收值，所述波长为溶解后的血样形成的血红蛋白色原的波长；(e) 报告有核红细胞的存在，及 (f) 报告血样中血红蛋白的浓度。如前述所述，该方法可进一步计数有核红细胞并报告每 100 个白细胞中有核红细
15 胞的数量。
20

进一步地，该方法还包括以下步骤：通过 DC 阻抗法测得剩余血细胞的计数，并从剩余血细胞数目中减去有核红细胞，以及报告血样中白细胞的数目。

如上所述描述了非聚焦血流孔中使用 DC 阻抗法测量有核血细胞，并
25 区分有核红细胞和其他细胞类型的方法。为同时测量血样中的血红蛋白浓度，溶解剂中含有一种血红蛋白配体，该配体在红细胞溶解后，形成稳定的血红蛋白色原。适合的配体包括四唑及其衍生物、咪唑及其衍生物、苯甲酸碱金属盐及其衍生物和喹哪啶酸。美国专利号 5,763,280（授予 Li 等）中描述了这些配体，这里全部引入作为参考。适合的咪唑衍生

物包括：甲基咪唑和乙基咪唑。可替换地，如前所述如果使用血液稀释剂稀释血样，还可在血液稀释剂中加入血红蛋白配体。此外，含有一种或多种盐的溶解剂也可以包含测量血红蛋白的血红蛋白配体，该溶解剂可在不另外使用血液稀释剂的情况下进行阻抗的测定。实施例 4 描述了一种这样的方法，该方法只用一种溶解剂而未另外使用血液稀释剂，对血样中的 NRBCs 进行鉴别并测量血样中的血红蛋白的浓度。

血样中的总血红蛋白浓度可以通过在预定的波长下测定血样混合物的分光光度吸收值而确定。不同的血红蛋白色原的波长不同。使用上述配体，可在约 510 nm 和约 560 nm 之间测定该吸收值。

实施例 5 描述了使用本发明的方法分析临床样品。使用试验血液分析仪（实施例 1 中详述了该仪器的结构）分析共 95 份正常血样和含有 NRBCs 的 74 份临床全血样，并使用以实施例 5 的溶解剂组合物，以 Isoton[®] III 作为稀释剂。同样的样品经过 COULTER[®] GEN[®]S 血液分析仪和 COULTER COULTER[®] ZBI 的分析作为参考。使用 NCCLS 标准法对每 500 个细胞进行人工计数，所得的每 100 个 WBC 中的 NRBC 数目作为参考值。

试验血液分析仪中得到的 DC 分布图经过实验推导分析，将 NRBCs 从白细胞中鉴别出来，并报告每 100 个 WBC 中的 NRBC 数目。从总有核细胞数中减去 NRBCs 即得到校正的白细胞计数。

图 5A 表示 NRBC 计数的结果，该结果表明本发明的方法获得的结果和人工参考值有良好的线性关系。

图 5B 表示使用实施例所述的方法和 COULTER[®] GEN[®]S 测得的血红蛋白浓度的关系。该结果表明这两种测量血红蛋白的方法之间有极好的线性关系。

图 5C 表示参考校正值与本发明的方法所得白细胞校正值之间的关系。参考结果为从 COULTER COULTER[®] ZBI 测得的白细胞数中减去 NRBC 的人工计数所得的数值。如图所示，通过本发明的方法获得的结果与参考值之间有极好的相关性。

进一步地，本发明涉及鉴别血样中有核血细胞的装置。该装置包括 (a) 将血样与溶解剂体系混合以溶解红细胞并形成血细胞样品混合物的

设备；(b)在非聚焦孔中测定血样混合物的DC阻抗，并获得血样混合物中血细胞的分布的设备；(c)通过获得的血细胞分布图，鉴别有核红细胞和其他细胞类型的设备。该非聚焦孔的长宽比优选为1.0或1.0以上。

以下实施例是对本发明示例性的说明，并非以任何方式限制本发明的范围，本发明的范围如权利要求所限定。如前所述，本发明亦可选用多种其他组分和不同比例。

实施例 1

使用如下组分的试剂溶解血样，进行有核血细胞的分析。

溴化十四烷基三甲基铵	25.0g
Igepal SS-837(Rhône-Poulenc 生产)	15.0g
Pluorfac A38 prill 表面活性剂(BASF 公司生产)	4.0g
蒸馏水调至 1 升	
PH	5.0

试验血液分析仪吸入 28 微升全血样，经 6 毫升 Isoton[®] III(佛罗里达州，迈阿密，Beckman Coulter 公司生产)稀释，并与 1 毫升上述溶解剂组合物混合以溶解红细胞。该样品混合物在持续真空装置的作用下，通过一组平行的三个非聚焦血流孔。该孔长 120 μ，宽 100 μ。有核血细胞通过 DC 阻抗测量法进行计数，并生成经过脉冲编辑处理后的血细胞分布图（为三孔测量的均值）。

图 1A 表示通过以上步骤获得的新鲜正常血的细胞分布图，其中白细胞呈双重模式分布。图 1B 和 1C 表示通过以上步骤测得的两份临床样品。所述临床样品分别含有 230 NRBC/100 WBC 和 9 NRBC/100 WBC。如图所示，明显的 NRBC 群体出现在白细胞的左侧。该 NRBC 群体从白细胞中鉴别出来，NRBCs 与白细胞（×100）的比例表示为 NRBC 数/100 WBC。可替换地，通过考虑全部的白细胞数目后，也可按血样中的绝对值报告 NRBC。

实施例 2

图 2A 和 2B 分别表示正常血样和含有 NRBCs 的临床样品的分布图，该样品经过实施例 1 中描述的步骤处理，在具有单一非聚焦血流孔的试验血液分析仪上进行测量。孔长 70 μ，宽 100 μ。其长宽比为 0.7。该试验血液分析仪与实施例 1 中使用的分析仪的信号放大比例不同。如图所示，NRBC 群体出现在白细胞的左侧。

实施例 3

图 3A 和 3B 是两张含有 NRBCs 的临床样品的分布图，该样品经过实施例 1 中所述步骤处理，并在两台试验血液分析仪上进行测量，除了其中一台分析仪的非聚焦血流孔长 120 μ，宽 100 μ，另一台的非聚焦血流孔长 85 μ，宽 70 μ 外，两台试验血液分析仪使用的试剂和仪器结构均相同。图 3A 中所示的分布图是使用长 120 μ，宽 100 μ 的非聚焦血流孔得到的。图 3B 中所示的分布图是使用长 85 μ，宽 70 μ 的非聚焦血流孔得到的。尽管这两种类型的孔长和宽完全不同，其长宽比均为 1.2。明显地，该两张分布图表示的细胞分布相似。在两种情况下，均可达到区分 NRBC 群体和其他有核细胞。

实施例 4

制备如下组分的试剂。

溴化十四烷基三甲基铵	3.48g
Igepal SS-837 (Rhône-Poulenc 生产)	2.09g
Plurofac A38 prill 表面活性剂 (BASF 公司生产)	0.56g
四唑	0.28g
Na ₂ SO ₄	7.94g
NaCl	3.46g
Na ₂ EDTA	0.09g
ADA	1.21g
抗菌素	0.98g
BHT (预先溶于乙醇)	0.01g
蒸馏水调至 1 升	
pH	5.8
渗透压	312 mOsm

使用试验血液分析仪对含有 31 NRBC/100 WBC (人工参考方法测得) 的临床全血样进行分析，该分析仪与实施例 1 所述的试验血液分析仪结构相同，但是上述溶解剂组合物同时作为溶解剂和稀释剂。

图 4A 代表获得的分布图，表明了将 NRBC 与白细胞区分开。

此外，11.6 微升同一样品与 2903 微升上述溶解剂组合物稀释并混合。立即在 Beckman DU 7500 分光光度计中测量样品的光吸收谱。图 4B 是所得的吸收谱。如图所示，样品中的血红蛋白浓度可在约 510 nm 和约 560nm 之间测出。

实施例 5

制备如下组分的试剂。

溴化十四烷基三甲基铵	25.0g
Igepal SS-837 (Rhône-Poulenc 生产)	15.0g
Plurofac A38 prill 表面活性剂 (BASF 公司生产)	4.0g
四唑	2.0g
BHT (预先溶于乙醇)	0.04g
蒸馏水调至 1 升	
pH	2.9

在实施例 1 所述的试验血液分析仪上分析 95 份正常样品和含有 NRBC 的 74 份临床全血样，但是使用的孔长 85 μ，宽 70 μ。该分析仪使用上述溶解剂和 Isoton® III 稀释剂。计数有核血细胞后，立刻在分析仪上于 525 nm 测定该样品混合物的吸收值。分析仪还报告样品的血红蛋白浓度。该样品也由 COULTER® GEN®S 血液分析仪和 COULTER COULTER® ZBI 进行分析。在生产商说明书中的标准设置下操作 COULTER® GEN®S，以 Lyse S® III diff (佛罗里达州，迈阿密，Beckman Coulter 公司) 作为溶解剂，Isoton® III 作为稀释剂。血样中的白细胞计数按 NCCLS 参考步骤在 COULTER COULTER® ZBI 中进行。COULTER COULTER® ZBI 的阈值设置在 7.5 以保证有核红细胞的计数。三名医学检验员对所有的临床样品进行 500 个细胞的计数，并作为有核红细胞计数的参考值，结果按每 100 个白细胞计数中的有核红细胞数量表示 (NRBC 数/100 WBC)。

分析实验推导得出的 DC 分布图以区分有核红细胞与白细胞，并报告每 100 个白细胞的有核红细胞数量。然后从总有核血细胞数量中减去有核红细胞的数目就得到校正的白细胞计数。

图 5A 表示相对于人工参考值，通过上述方法获得的有核红细胞计数的结果。其相关系数，斜率和回归线的截距表明，该有核红细胞具有良好的线性关系。

图 5B 表示试验血液分析仪和 COULTER® GEN®S 血液分析仪所测得的血红蛋白浓度的结果间的关系。该结果表明血红蛋白浓度有极好的线性关

系。

图 5C 表示采用上述方法在试验血液分析仪上得到校正的白细胞计数与从 COULTER COULTER® ZBI 测得的白细胞数目中减去人工计数的有核红细胞数目所得校正的白细胞计数之间的关系。结果表明本发明的方法与
5 所述参考方法有极好的线性关系。

实施例 6 进一步说明了本发明的作用，即区分有核红细胞和白细胞以及进一步鉴别白细胞亚群如淋巴和髓样亚群。

实施例 6

使用如下组分的试剂溶解血样并分析有核血细胞。

溴化十四烷基三甲基铵	35.0g
Igepal SS-837 (Rhône-Poulenc 生产)	12.8g
氯化钠	9.0g
氰化钾	0.25g
蒸馏水调至 1 升	
pH	9.3

10 试验血液分析仪吸入 28 微升全血样，经 6 毫升 Isoton® 3E (佛罗里达州，迈阿密，Beckman Coulter 公司) 稀释，并与 1 毫升上述的溶解剂组合物混合以溶解红细胞。该样品混合物在持续真空装置的作用下，通过一组平行的三个非聚焦血流孔。该孔长 100 μ，宽 83 μ。有核血细胞通过 DC 阻抗测量法进行计数，并生成经过脉冲编辑处理后的血细胞分布
15 图（代表三孔测量的均值）。

图 6 表示通过以上步骤获得的含有 4 NRBC/100 WBC 的临床血样的分布图。如图所示，三种有核血细胞彼此区分开。更具体地，有核红细胞的峰位于白细胞峰的左侧。白细胞进一步分成两个亚群，淋巴（淋巴细胞）群体和髓样（中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细
20 胞）群体。本实施例表明了本发明的方法在区分有核红细胞和白细胞以及进一步区分白细胞亚群中的用途。

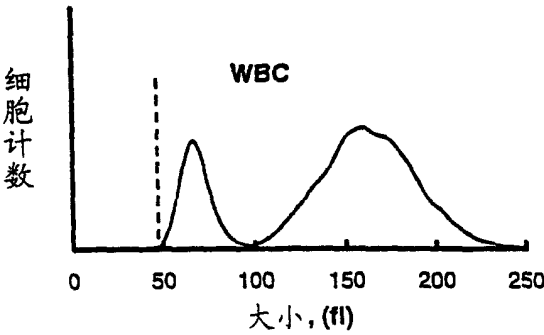


图 1A

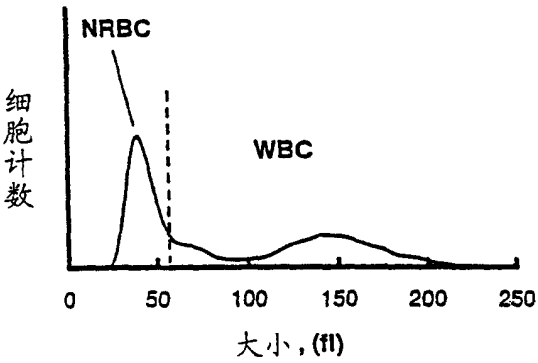


图 1B

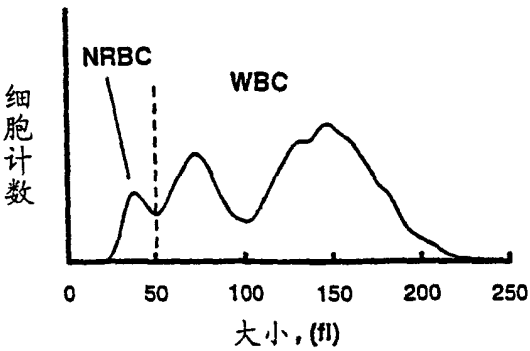


图 1C

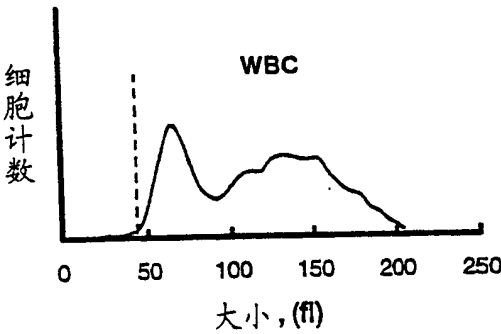


图 2A

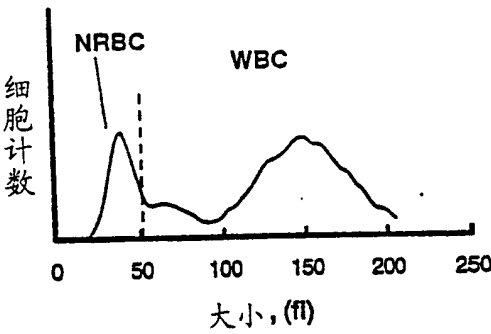


图 2B

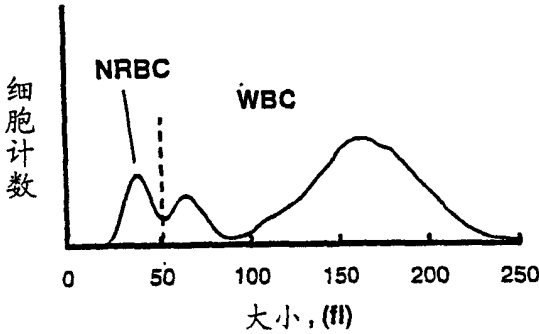


图 3A

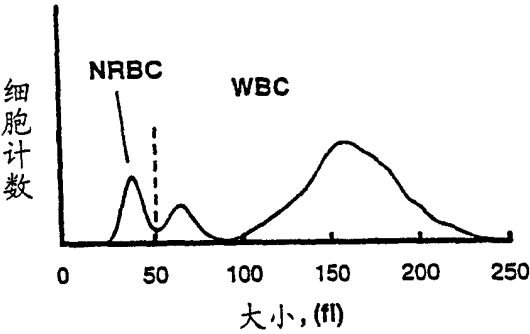


图 3B

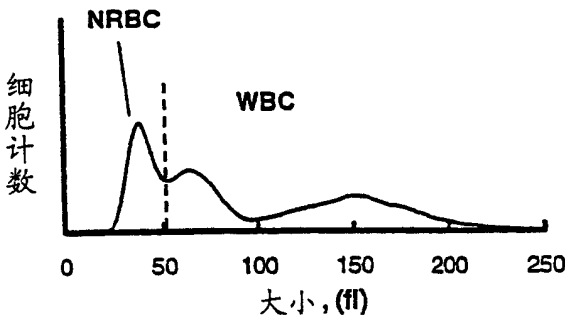


图 4A

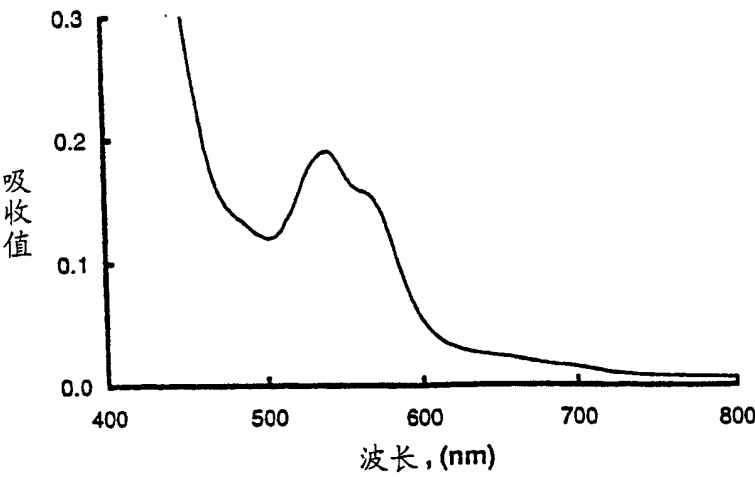


图 4B

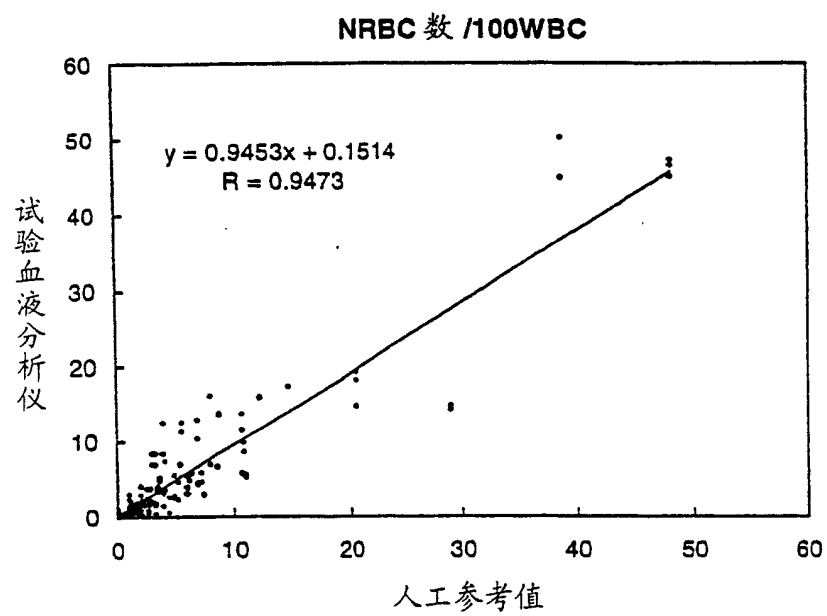


图 5A

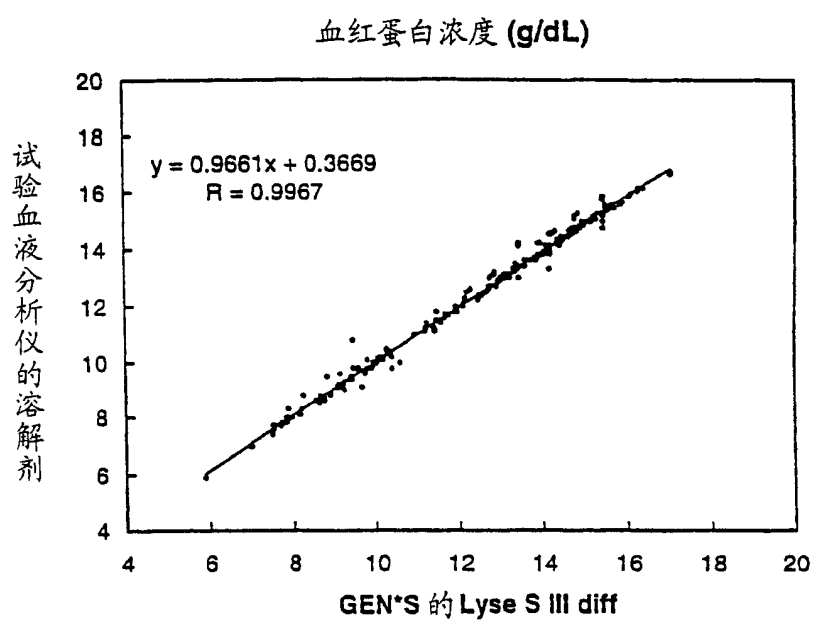


图 5B

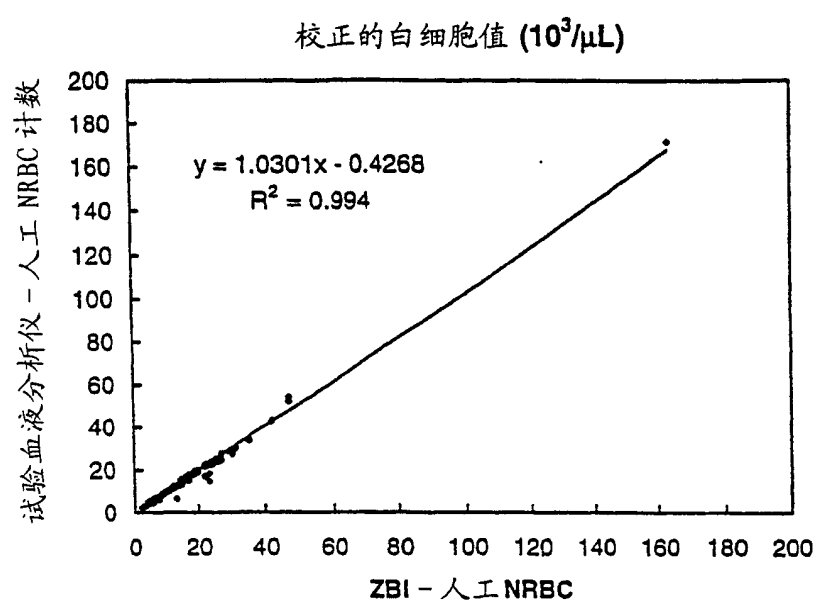


图 5C

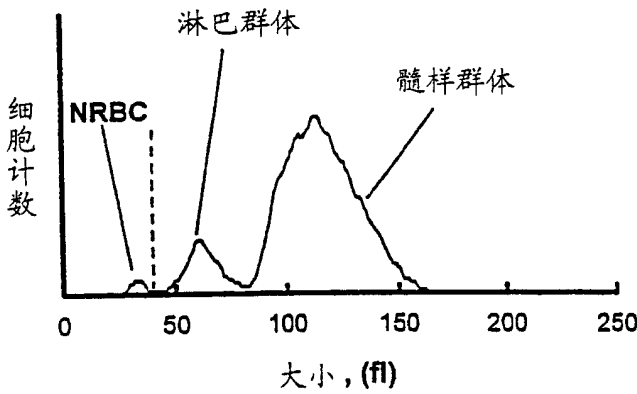


图 6