



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119198450 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 27

(21) 申请号 202411317358.7

(22) 申请日 2024.09.20

(71) 申请人 广东省大湾区华南理工大学聚集诱导发光高等研究院

地址 510700 广东省广州市黄埔区开源大道11号科技企业加速器C3栋401室

(72) 发明人 唐本忠 张悦 龚晚君 王志明 刘勇

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理师 江裕强 刘远

(51) Int. Cl.

G01N 15/01 (2024.01)

G01N 15/1434 (2024.01)

G01N 15/149 (2024.01)

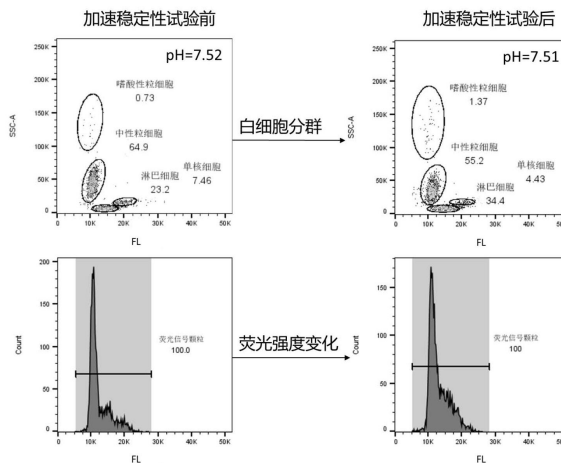
权利要求书4页 说明书11页 附图5页

(54) 发明名称

一种基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂及其制备方法和应用

(57) 摘要

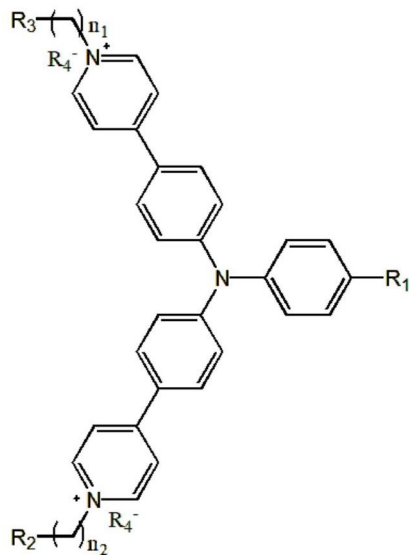
本发明公开了一种基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂及其制备方法和应用;本发明的白细胞分类试剂包括以下组分:AIE荧光染料、表面活性剂、芳香族有机酸和水;其中,所述表面活性剂包括质量比为0.5~5:1的非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂,或质量比为0.5~20:1的非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂。本发明的白细胞分类试剂兼具红细胞裂解功能和白细胞荧光染色功能,并具有良好的储存稳定性,仅采用单一试剂即可实现对血液样本的预处理,极大地简化了白细胞分类与计数分析的血液试样预处理操作流程,有效减少了测试误差,提高检测结果的可靠性。



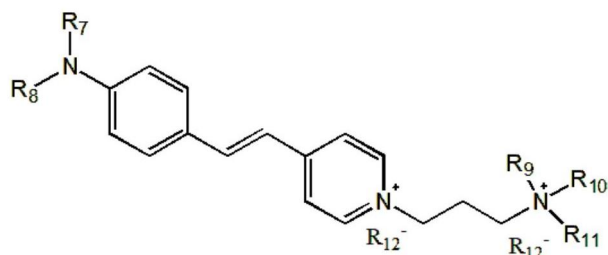
1. 一种基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂,其特征在于,包括以下组分:AIE荧光染料、表面活性剂、芳香族有机酸和水;

其中,所述表面活性剂包括质量比为0.5~5:1的非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂,或质量比为0.5~20:1的非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂;

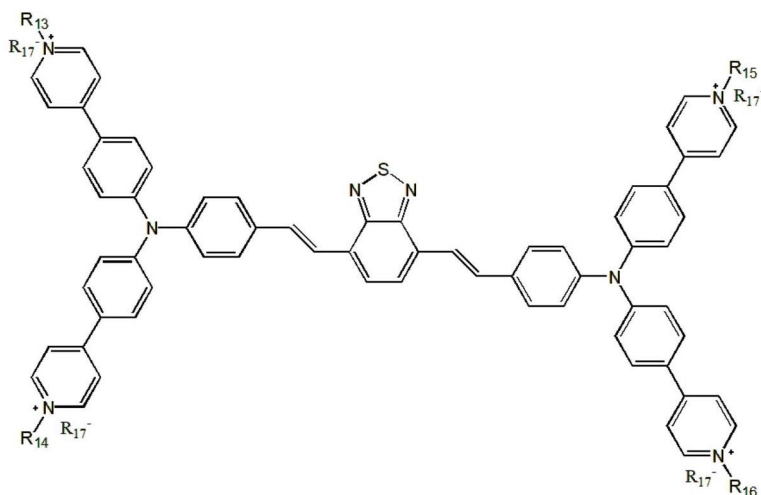
所述AIE荧光染料选自式(1)~式(4)中的任意一种:



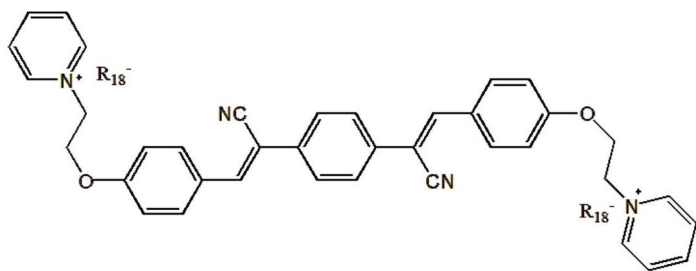
式 (1)



式 (2)



式 (3)



式 (4)



R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 各自独立选自-H、-CH₃、-COOH、-OH、-NH₂、-CHO、-CN中的任意一种;

R_6 选自-H、-CN、-CH₃中的任意一种;

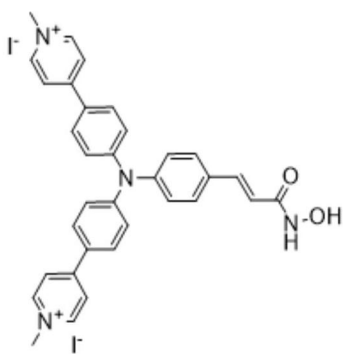
R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 各自独立选自具有1~20个碳原子的直链烷基或支链烷基中的任意一种;

R_4^- 、 R_{12}^- 、 R_{17}^- 、 R_{18}^- 为阴离子;

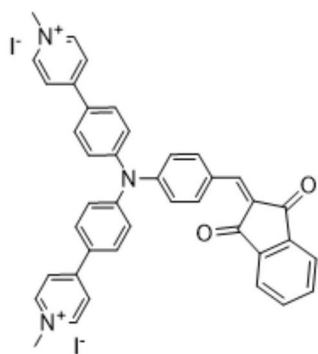
n_1 、 n_2 各自独立为1~20的正整数。

2. 根据权利要求1所述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂,其特征在于,所述的白细胞分类试剂中,AIE荧光染料的质量含量为0.4mg/L~50mg/L。

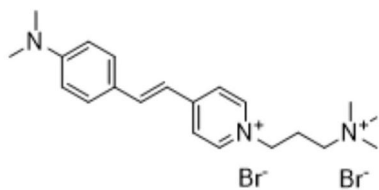
3. 根据权利要求1所述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂,其特征在于,所述AIE荧光染料选自式I-式V中的一种;



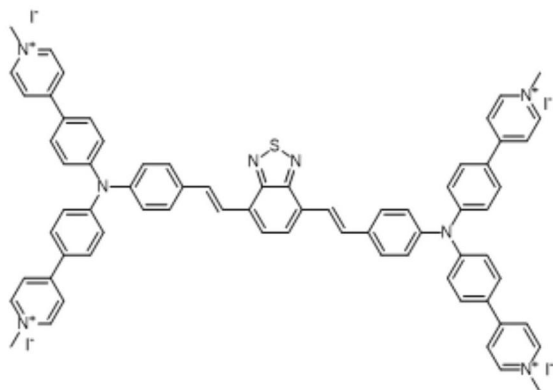
式 I



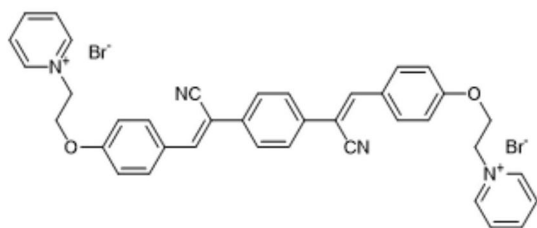
式 II



化学式III



式IV



式 V。

4. 根据权利要求1所述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂,其特征在于,所述的白细胞分类试剂中,表面活性剂的总质量含量为0.5g/L~10g/L;

所述的非离子表面活性剂选自鲸蜡硬脂醇聚醚-25、聚氧乙烯十二烷醚Brij 35、脂肪醇聚氧乙烯醚-5、聚氧乙烯(20)油醚中的任意一种或多种;

所述的阳离子表面活性剂选自十二烷基三甲基氯化铵、十四烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵中的任意一种或多种;

所述的阴离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、N-月桂酰肌氨酸钠盐中的任意一种或

多种。

5. 根据权利要求1所述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂,其特征在于,所述的白细胞分类试剂中,芳香族有机酸的质量含量为0.5g/L ~ 15g/L;

所述芳香族有机酸选自水杨酸、邻苯二甲酸、咖啡酸中的任意一种。

6. 根据权利要求1所述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂,其特征在于,所述的白细胞分类试剂中,还包括缓冲盐;

所述缓冲盐选自磷酸盐、Tris、HEPES中的任意一种或多种;

所述缓冲盐的质量含量为0.05g/L ~ 15g/L;

所述白细胞分类试剂的pH为6.0 ~ 8.0。

7. 权利要求1-6任一项所述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将AIE荧光染料、表面活性剂和芳香族有机酸溶解在水中,调节pH值,过滤,得到基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂。

8. 权利要求1-6任一项所述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂在血液中白细胞分类检测中的应用。

9. 一种白细胞分类检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

将血液样本与权利要求1-6任一项所述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂混合,孵育1-2min,制得试样,将试样导入流式细胞仪测定散射光和荧光信号,根据其散射光和荧光信号对白细胞进行分类和/或计数。

10. 根据权利要求9所述的白细胞分类检测方法,其特征在于,所述血液样本为外周血全血、静脉血或末梢血;

所述血液样本与白细胞分类试剂按体积比1:25 ~ 1:50混合。

一种基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于细胞生物学技术领域,尤其涉及一种基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 人体血液中的白细胞是免疫系统的重要组成部分,根据其形态和功能的不同,可以分为单核细胞、淋巴细胞和粒细胞(包括嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和嗜碱性粒细胞)五个亚类。这些白细胞在人体健康状态下保持着相对恒定的比例,但在疾病状态下,其数量和比例会发生变化,为疾病的诊断提供重要依据。因此,通过对白细胞分类计数分析,对评估人体免疫功能和多种疾病的诊断及治疗具有十分重要的临床意义。

[0003] 利用血液细胞分析仪对血液样本中白细胞的分类和计数通常需要使用溶血剂和核酸染料对样本进行预处理。溶血剂用于溶解血液中大量存在的红细胞,暴露出白细胞,便于后续的计数和分类;核酸染料可通过白细胞的细胞膜进入细胞内部,与胞内的核酸物质结合后可发出荧光。由于白细胞中各亚群细胞的细胞大小、胞内结构有所差异,胞内核酸与荧光染料结合后发出的荧光强度也有所不同,因而能够通过检测各个细胞的散射光和荧光信号,将不同亚群的白细胞通过利用例如二维检测信息的散点图区分开,从而能够进行分类计数。

[0004] 目前,溶血剂和核酸染料是作为独立试剂使用的,通常是先采用溶血剂与血液样本混合处理,随后加入核酸染料进行染色,再将试样导入血液分析仪进行分类和计数分析;也可以溶血剂和核酸染料先混合,再加入血液样本混合,但是需要现配现用。这主要是源于现有的核酸染料与溶血剂混合后体系不稳定,会使试剂的溶血性能和核酸染色性能下降,影响检测结果的准确性。然而,针对单一的白细胞分类计数项目,需要涉及两种独立试剂的配制和使用,不仅增加了试剂的生产、运输、包装成本,而且由于血液分析对于精密度和准确度要求高,对试样进行多步处理操作更容易导致测试结果出现偏差,这就对检验人员的专业性有更高要求。

[0005] 因此,探索一体化设计的白细胞分类试剂解决方案,将溶血与染色功能结合于单一试剂之中,以简化操作流程、降低成本,并显著提升检测的稳定性和准确性,这对于白细胞分析技术领域会是一项重要的技术突破。

发明内容

[0006] 针对上述问题,本发明提供一种基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂及其制备方法和应用;本发明的白细胞分类试剂同时具有红细胞裂解功能和白细胞荧光染色功能,并具有良好的储存稳定性,该试剂可直接应用于血液样本,实现了白细胞的一步法标记,极大地简化了试样处理操作流程,有效减少了测试误差,提高检测结果的可靠性。通过流式细胞仪的精准检测,利用散射光信号与荧光信号的双重分析,能够对白细胞进行高效、准确的分

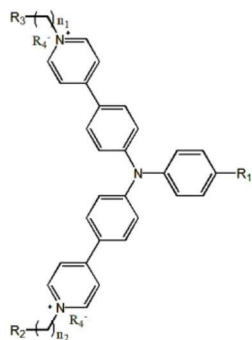
类和/或计数,同时可以对异常白细胞进行识别,如原始细胞和未成熟粒细胞。

[0007] 本发明的技术方案如下:

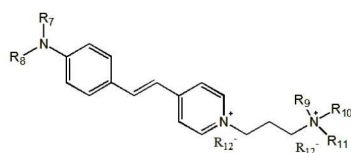
[0008] 一种基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂,包括以下组分:AIE荧光染料、表面活性剂、芳香族有机酸和水;

[0009] 其中,所述表面活性剂包括质量比为0.5~5:1的非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂,或质量比为0.5~20:1的非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂;

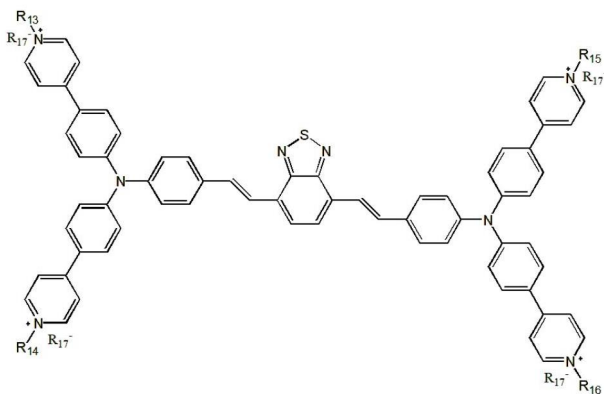
[0010] 所述AIE荧光染料选自式(1)~式(4)中的任意一种:



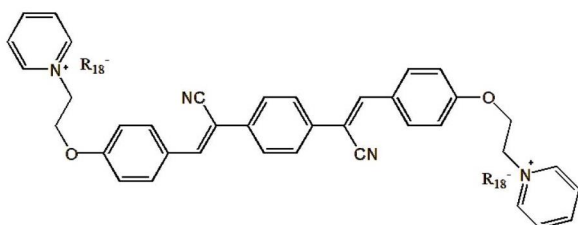
式(1)



式(2)

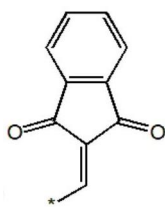


式(3)

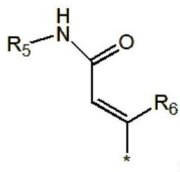


式(4)

[0013] 其中,所述 R_1 选自



或



*表示取代位置;

[0014] R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 各自独立选自-H、-CH₃、-COOH、-OH、-NH₂、-CHO、-CN中的任意一种;

[0015] R_6 选自-H、-CN、-CH₃中的任意一种;

[0016] R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 各自独立选自具有1~20个碳原子的直链烷基或支链烷基中的任意一种;

[0017] R_4^- 、 R_{12}^- 、 R_{17}^- 、 R_{18}^- 为阴离子;

[0018] n_1 、 n_2 各自独立为1~20的正整数。

[0019] 优选地, R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 各自独立选自具有1~6个碳原子的直链烷基或支链烷基中的任意一种。

[0020] 优选地,阴离子为一价阴离子;

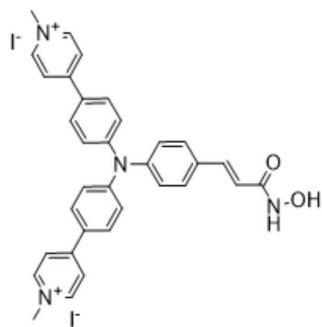
[0021] 进一步优选地,一价阴离子选自F⁻、Cl⁻、Br⁻、I⁻、NO₂⁻、NO₃⁻、BF₄⁻、PF₆⁻、SbF₆⁻、ClO₄⁻中的一种或多种。

[0022] 优选地, n_1 、 n_2 各自独立为1~6的正整数。

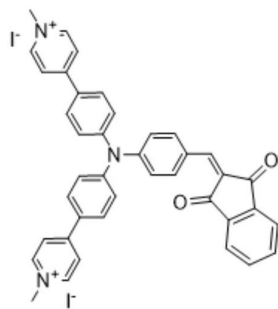
[0023] 优选地,所述的白细胞分类试剂中,AIE荧光染料的质量含量为0.4mg/L~50mg/L。

[0024] 进一步优选地,所述的白细胞分类试剂中,AIE荧光染料的质量含量为2mg/L~30mg/L。

[0025] 优选地,所述AIE荧光染料选自式I-式V中的一种;

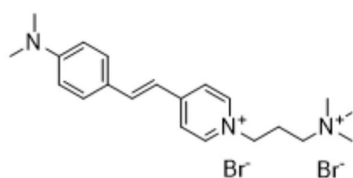


式 I

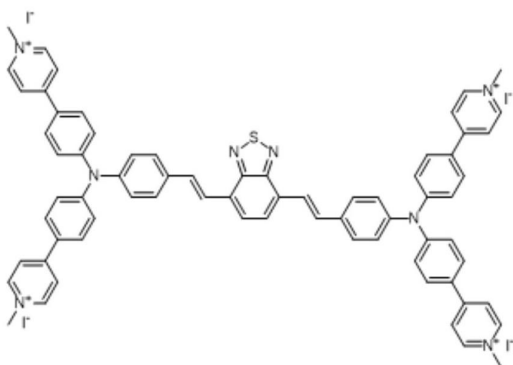


式 II

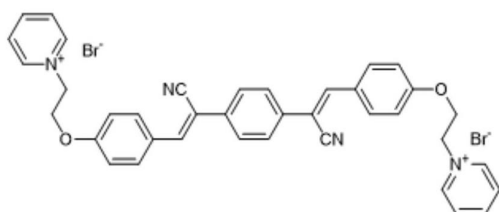
[0026]



化学式 III



式 IV



式 V。

[0027] 优选地,所述表面活性剂包括质量比为1.5~3:1的非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂,或质量比为0.6~12:1的非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂;

- [0028] 优选地,所述的白细胞分类试剂中,表面活性剂的总质量含量为0.5g/L~10g/L;
- [0029] 优选地,所述的非离子表面活性剂选自鲸蜡硬脂醇聚醚-25、聚氧乙烯十二烷基醚Brij35、脂肪醇聚氧乙烯醚-5、聚氧乙烯(20)油醚中的任意一种或多种;
- [0030] 优选地,所述的阳离子表面活性剂选自十二烷基三甲基氯化铵、十四烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵中的任意一种或多种;
- [0031] 优选地,所述的阴离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、N-月桂酰肌氨酸钠盐中的任意一种或多种。
- [0032] 优选地,所述的白细胞分类试剂中,芳香族有机酸的质量含量为0.5g/L~15g/L;
- [0033] 优选地,所述芳香族有机酸选自水杨酸、邻苯二甲酸、咖啡酸中的任意一种。
- [0034] 进一步优选地,所述芳香族有机酸为邻苯二甲酸。
- [0035] 优选地,所述的白细胞分类试剂中,还包括缓冲盐;
- [0036] 进一步优选地,所述缓冲盐选自磷酸盐、Tris、HEPES中的任意一种或多种;
- [0037] 进一步优选地,所述缓冲盐的质量含量为0.05g/L~15g/L;
- [0038] 优选地,所述白细胞分类试剂的pH为6.0~8.0。
- [0039] 进一步优选地,所述白细胞分类试剂的pH为6.5~7.5。
- [0040] 上述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂的制备方法,包括以下步骤:
- [0041] 将AIE荧光染料、表面活性剂和芳香族有机酸溶解在水中,调节pH值,过滤,得到基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂。
- [0042] 上述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂在血液中白细胞分类检测中的应用。具体用于白细胞的分类或计数。
- [0043] 一种白细胞分类检测方法,包括以下步骤:
- [0044] 将血液样本与上述的基于AIE荧光染料的白细胞分类试剂混合,孵育1-2min,制得试样,将试样导入流式细胞仪测定散射光和荧光信号,根据其散射光和荧光信号对白细胞进行分类和/或计数。
- [0045] 优选地,所述血液样本为外周血全血、静脉血或末梢血;
- [0046] 优选地,所述血液样本与白细胞分类试剂按体积比1:25~1:50混合。
- [0047] 相对于现有技术,本发明具有如下的优点及有益效果:
- [0048] 本发明在研究中意外发现,采用特定的AIE荧光染料与表面活性剂和芳香族有机酸混合能够配制得到体系稳定的白细胞分类试剂,兼具红细胞裂解功能和白细胞荧光染色功能,仅采用单一试剂即可实现对血液样本的预处理,极大地简化了白细胞分类与计数分析的血液试样预处理操作流程,有效减少了测试误差,提高检测结果的可靠性。
- [0049] 本发明实现了溶血与染色功能结合于单一试剂的一体化白细胞分类试剂,既简化了操作流程,且能够保证储存稳定性(37℃放置14天荧光强度变化小于等于15%,pH变化小于等于0.5)、检测稳定性和准确性,同时大大降低了试剂的生产、运输、包装成本,这对于白细胞分析技术领域会是一项重要的技术突破。
- [0050] 本发明直接将白细胞分类试剂与血液样本混合处理后,即通过流式细胞仪的精准检测,利用散射光信号与荧光信号的双重分析,能够对白细胞进行高效、准确的分类和/或计数。

附图说明

- [0051] 图1是实施例1-1AIE白细胞分类试剂效果图及结果统计；
 [0052] 图2是实施例2-1AIE白细胞分类试剂效果图及结果统计；
 [0053] 图3是实施例3AIE白细胞分类试剂效果图及结果统计；
 [0054] 图4是实施例4AIE白细胞分类试剂效果图及结果统计；
 [0055] 图5是对比例1-1AIE白细胞分类试剂效果图及结果统计；
 [0056] 图6是对比例2AIE白细胞分类试剂效果图及结果统计；
 [0057] 图7是对比例3AIE白细胞分类试剂效果图及结果统计。

具体实施方式

[0058] 下面结合实施例对本发明进行具体地描述,但本发明的实施方式和保护范围不限于以下实施例。

[0059] 实施例1:

[0060] AIE白细胞分类试剂:分别按照表1组分配制。

[0061] 将AIE荧光染料、表面活性剂和芳香族有机酸完全溶解在水中,用氢氧化钠溶液和盐酸溶液调节溶液pH值,用水定容至100mL,最后用0.2 μ m的滤膜将配置好的溶液过滤一遍,即得到AIE白细胞分类试剂。

[0062] 表1

[0063]	组分	实施例 1-1	实施例 1-2	实施例 1-3
	邻苯二甲酸	664.53mg	0	0
	水杨酸	0	552mg	0
	咖啡酸	0	0	720mg
[0064]	十二烷基三甲基氯化铵 LTAC	53mg	53mg	53mg
	聚氧乙烯十二烷醚 Brij35	120mg	120mg	120mg
	荧光染料式III	485 μ g	485 μ g	485 μ g
	pH	7.5	7.5	7.5
	水溶解定容至	100mL	100mL	100mL

[0065] 检测步骤:临床上取20 μ L新鲜正常血液样本与800 μ L AIE白细胞分类试剂混匀,孵育60-120s,形成待测试样。用流式细胞仪测定其侧向散射光和荧光信号。

[0066] 将AIE白细胞分类试剂在37 $^{\circ}$ C摇床里放置14天后(根据阿伦尼乌斯公式作为试剂稳定性研究的理论基础,对于2~8 $^{\circ}$ C存放的试剂,在37 $^{\circ}$ C下放置14天约等于4 $^{\circ}$ C放置13个月,后面同理,不赘述。),先观察AIE白细胞分类试剂是否有晶体析出或颜色变化,用pH计测定其pH值,再应用上述检测步骤进行侧向散射光和荧光信号检测,评估其对白细胞分类效果,测定结果如图1和表2所示。

[0067] 表2

	白细胞分群 效果	荧光强度 变化	pH 变化	晶体析出或 颜色变化
[0068] 实施例 1-1	四分群	+0.5%	-0.01	无
实施例 1-2	四分群	-2%	-0.15	无
实施例 1-3	四分群	-0.5%	-0.1	无

[0069] 实施例2:

[0070] AIE白细胞分类试剂:分别按照表3组分配制。

[0071] 将AIE荧光染料、表面活性剂、缓冲盐(磷酸二氢钠)和芳香族有机酸完全溶解在水中,用氢氧化钠溶液和盐酸溶液调节溶液pH值,用水定容至100mL,最后用0.2 μ m的滤膜将配置好的溶液过滤一遍,即得到AIE白细胞分类试剂。

[0072] 表3

组分	实施例 2-1	实施例 2-2
十二烷基硫酸钠	137 mg	137 mg
邻苯二甲酸	100 mg	100 mg
磷酸二氢钠	24mg	24mg
鲸蜡硬脂醇聚醚-25	84mg	84mg
荧光染料式 I	768 μ g	0
荧光染料式 II	0	839 μ g
pH	6.5	6.5
水溶解定容至	100mL	100mL

[0075] 检测步骤:临床上取20 μ L新鲜正常血液样本与800 μ L AIE白细胞分类试剂混匀,孵育60-120s,形成待测试样。用流式细胞仪测定其侧向散射光和荧光信号。

[0076] 将AIE白细胞分类试剂在37 $^{\circ}$ C摇床里放置14天后,先观察AIE白细胞分类试剂是否有晶体析出或颜色变化,用pH计测定其pH值,再应用上述检测步骤进行侧向散射光和荧光信号检测,评估其对白细胞分类效果,测定结果如图2和表4所示。

[0077] 表4

	白细胞分群 效果	荧光强度 变化	pH 变化	晶体析出或 颜色变化
[0078] 实施例 2-1	四分群	+0.7%	-0.02	无
实施例 2-2	四分群	-0.5%	-0.01	无

[0079] 实施例3:

[0080] AIE白细胞分类试剂配制:将十二烷基三甲基氯化铵LTAC 53mg,聚氧乙烯十二烷基醚Brij35 120mg,邻苯二甲酸664.53mg,荧光染料式IV1550 μ g完全溶解在水中,用氢氧化钠溶液和盐酸溶液调节溶液pH值为7.5,用水定容至100mL,最后用0.2 μ m的滤膜将配置好的溶液过滤一遍,即得到AIE白细胞分类试剂。

[0081] 检测步骤:临床上取20 μ L新鲜正常血液样本与800 μ L AIE白细胞分类试剂混匀,孵育60-120s,形成待测试样。用流式细胞仪测定其侧向散射光和荧光信号。

[0082] 将AIE白细胞分类试剂在37 $^{\circ}$ C摇床里放置14天后,先观察AIE白细胞分类试剂是否有晶体析出或颜色变化,用pH计测定其pH值,再应用上述检测步骤进行侧向散射光和荧光信号检测,评估其对白细胞分类效果,测定结果如图3和表5所示。

[0083] 表5

[0084]		白细胞分群 效果	荧光强度 变化	pH 变化	晶体析出或 颜色变化
	实施例 3	四分群	+1%	+0.02	无

[0085] 实施例4:

[0086] AIE白细胞分类试剂配制:将脂肪醇聚氧乙烯醚-5 200mg,N-月桂酰肌氨酸钠盐300mg,邻苯二甲酸83mg,荧光染料式V734 μ g完全溶解在水中,用氢氧化钠溶液和盐酸溶液调节溶液pH值为8.0,用水定容至100mL,最后用0.2 μ m的滤膜将配置好的溶液过滤一遍,即得到白细胞分类试剂。

[0087] 检测步骤:临床上取20 μ L新鲜正常血液样本与800 μ L AIE白细胞分类试剂混匀,孵育60-120s,形成待测试样。用流式细胞仪测定其侧向散射光和荧光信号。

[0088] 将AIE白细胞分类试剂在37 $^{\circ}$ C摇床里放置14天后,先观察AIE白细胞分类试剂是否有晶体析出或颜色变化,用pH计测定其pH值,再应用上述检测步骤进行侧向散射光和荧光信号检测,评估其对白细胞分类效果,测定结果如图4和表6所示。

[0089] 表6

[0090]		白细胞分群 效果	荧光强度 变化	pH 变化	晶体析出或 颜色变化
	实施例 4	四分群	-12.7%	-0.03	无

[0091] 对比例1:

[0092] AIE白细胞分类试剂:分别按照表7-1和表7-2组分配制。

[0093] 将AIE荧光染料、表面活性剂和有机酸完全溶解在水中,用氢氧化钠溶液和盐酸溶液调节溶液pH值,用水定容至100mL,最后用0.2 μ m的滤膜将配置好的溶液过滤一遍,即得到AIE白细胞分类试剂。

[0094] 表7-1

组分	对比例1-1	对比例1-2	对比例1-3	对比例1-4
乙酸	0.2mL	0	0	0

邻苯二甲酸	0	0	664.53mg	664.53mg
十二烷基三甲基氯化铵LTAC	53mg	53mg	20mg	133mg
聚氧乙烯十二烷醚Brij35	120mg	120mg	153mg	40mg
荧光染料式III	485μg	485μg	485μg	485μg
pH	7.5	7.5	7.5	7.5
水溶解定容至	100mL	100mL	100mL	100mL

[0096] 表7-2

组分	对比例 1-5	对比例 1-6	对比例 1-7	对比例 1-8
乙酸	0	0	0	0

邻苯二甲酸	664.53mg	664.53mg	83mg	83mg
十二烷基三甲基氯化铵 LTAC	12.25mg	337mg	0	0
聚氧乙烯十二烷醚 Brij35	27.75mg	763mg	0	0
脂肪醇聚氧乙烯醚-5	0	0	100mg	480mg
N-月桂酰肌氨酸钠盐	0	0	400mg	20mg
荧光染料式III	485μg	485μg	0	0
荧光染料式V	0	0	734μg	734μg
pH	7.5	7.5	8.0	8.0
水溶解定容至	100mL	100mL	100mL	100mL

[0099] 检测步骤:将20μL新鲜正常血液样本与800μL AIE白细胞分类试剂混匀,孵育60-120s,形成待测试样。用流式细胞仪测定其侧向散射光和荧光信号。

[0100] 将AIE白细胞分类试剂在37℃摇床里放置14天后,先观察AIE白细胞分类试剂是否有晶体析出或颜色变化,用pH计测定其pH值,再应用上述检测步骤进行侧向散射光和荧光信号检测,评估其对白细胞分类效果,测定结果如图5和表8所示。

[0101] 表8

[0102]

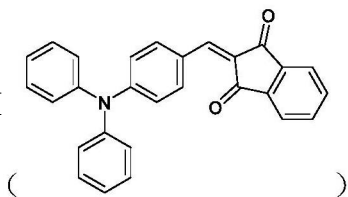
	白细胞分群 效果	荧光强度 变化	pH 变化	晶体析出或 颜色变化
对比例 1-1	三分群	-2.1%	-1.81	无
对比例 1-2	三分群	-1.7%	-0.01	无
对比例 1-3	三分群	+0.8%	+0.02	无
对比例 1-4	三分群	-4.2%	+0.15	无
对比例 1-5	三分群	-2.8%	-1.52	有晶体析出
对比例 1-6	三分群	-1.1%	-0.03	无
对比例 1-7	三分群	-6.1%	-0.62	无
对比例 1-8	三分群	-7.8%	-0.58	无

[0103] 对比例2:

[0104] AIE白细胞分类试剂配制:

[0105] 将十二烷基三甲基氯化铵LTAC 53mg, 聚氧乙烯十二烷基醚Brij35 120mg, 邻苯二甲

酸664.53mg, 荧光染料式VI 400 μ g完全溶解在水中, 用氢氧化钠溶



液和盐酸溶液调节溶液pH值为7.5, 用水定容至100mL, 最后用0.2 μ m的滤膜将配置好的溶液过滤一遍, 即得到AIE白细胞分类试剂。

[0106] 检测步骤: 临床上取20 μ L新鲜正常血液样本与800 μ L AIE白细胞分类试剂混匀, 孵育60-120s, 形成待测试样。用流式细胞仪测定其侧向散射光和荧光信号。测定结果如图6所示。

[0107] 对比例3:

[0108] 白细胞分类试剂配制:

[0109] 将十二烷基三甲基氯化铵LTAC 53mg, 聚氧乙烯十二烷基醚Brij35 120mg, 邻苯二甲酸664.53mg, Cy5 656 μ g完全溶解在水中, 用氢氧化钠溶液和盐酸溶液调节溶液pH值为7.5, 用水定容至100mL, 最后用0.2 μ m的滤膜将配置好的溶液过滤一遍, 即得到白细胞分类试剂。

[0110] 检测步骤: 临床上取20 μ L新鲜正常血液样本与800 μ L白细胞分类试剂混匀, 孵育60-120s, 形成待测试样。用流式细胞仪测定其侧向散射光和荧光信号。

[0111] 将白细胞分类试剂在37 $^{\circ}$ C摇床里放置14天后, 先观察白细胞分类试剂是否有晶体析出或颜色变化, 用pH计测定其pH值, 再应用上述检测步骤进行侧向散射光和荧光信号检测, 评估其对白细胞分类效果, 测定结果如图7和表9所示。

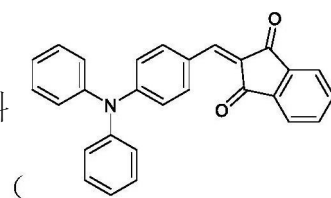
[0112] 表9

[0113]		白细胞分群 效果	荧光强度 变化	pH 变化	晶体析出或 颜色变化
	对比例 3	四分群	-100%	-0.02	颜色变淡

[0114] 数据分析：

[0115] 由上述实施例测试结果表明,本发明的AIE白细胞分类试剂可以实现白细胞亚群的分类,将其分成淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞,并且试剂储存稳定性好,经加速稳定性试验后试剂体系稳定,仍能够实现对白细胞亚群的分类。由实施例1-1、实施例1-2、实施例1-3比较可以看出,芳香族有机酸选择邻苯二甲酸,保证检测准确性的同时,储存稳定性最优。对比例1-1的有机酸采用乙酸、对比例1-2不添加有机酸,制得试剂不能将白细胞的单核细胞与淋巴细胞群分开,并且储存稳定性较差;对比例1-3至对比例1-8的结果表明,表面活性剂只有合适的质量比才能实现白细胞四分群和良好的储存稳定性,

过高过低性能都较差;对比例2采用AIE荧光染料



不能实现白细

(),

胞亚群的分类;对比例3采用Cy5荧光染料,试剂体系不稳定,经加速稳定性试验后,荧光强度显著下降,无法对白细胞亚群分类。

[0116] 以上实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

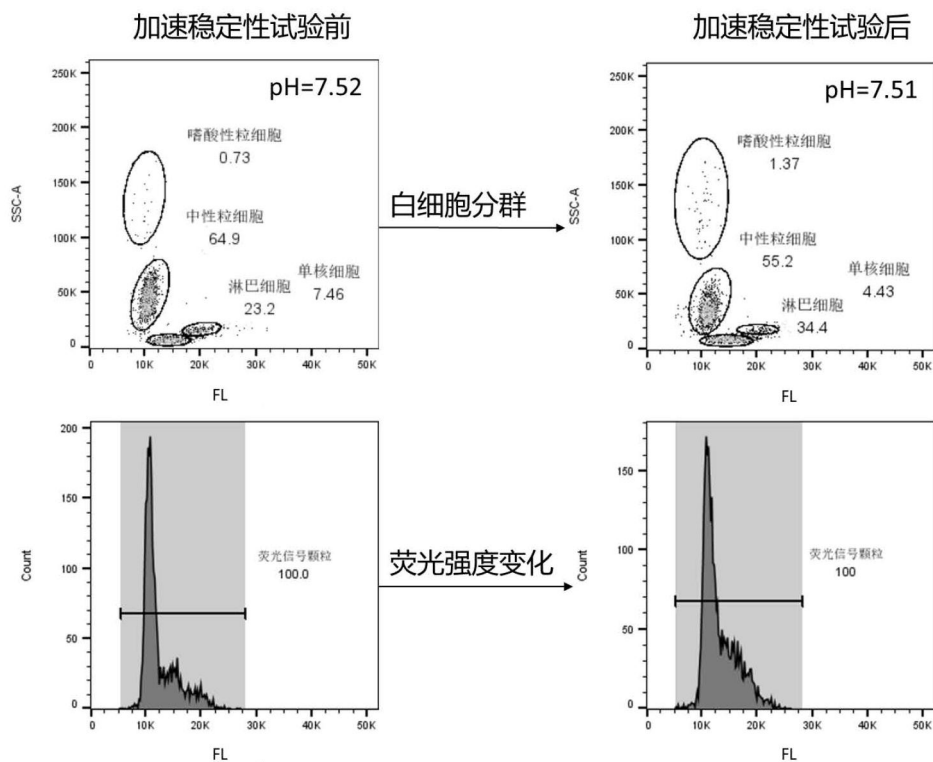


图1

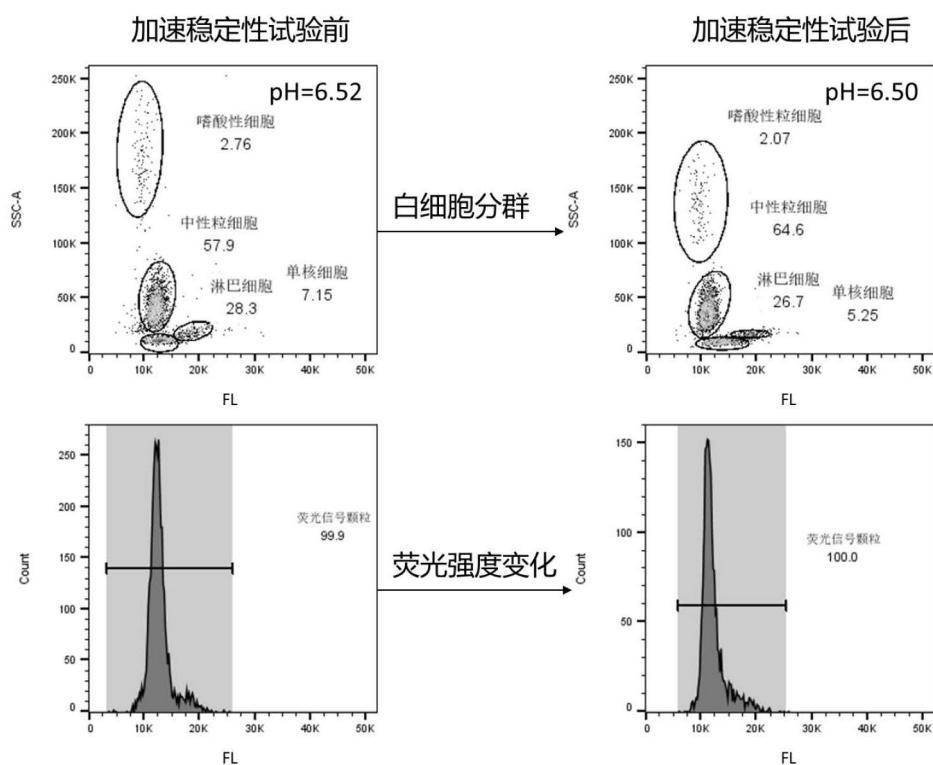


图2

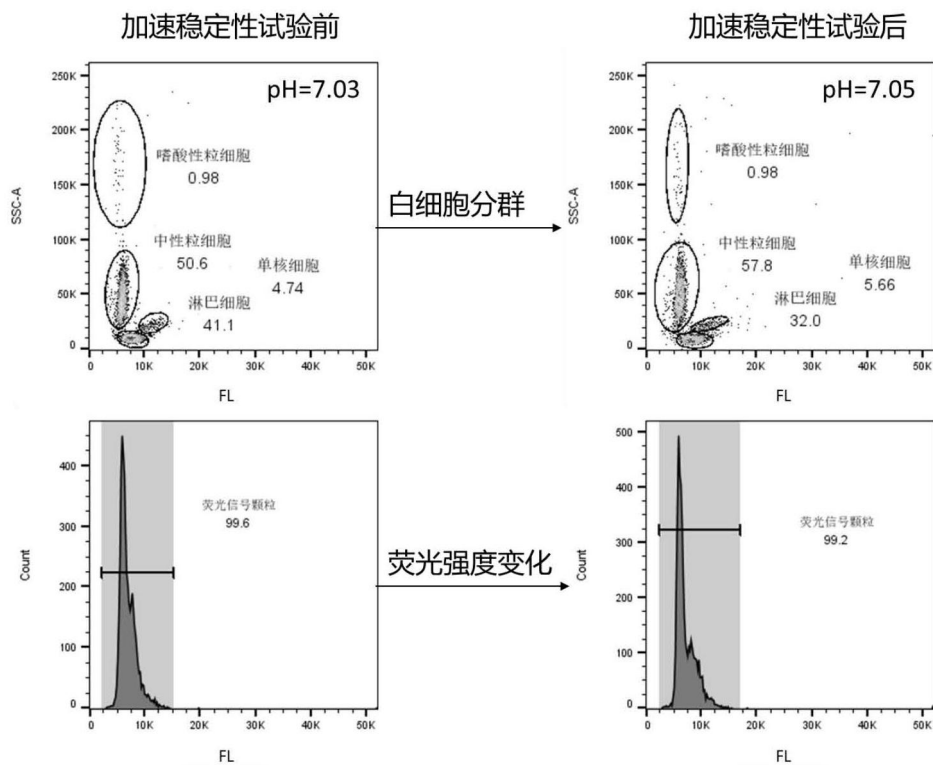


图3

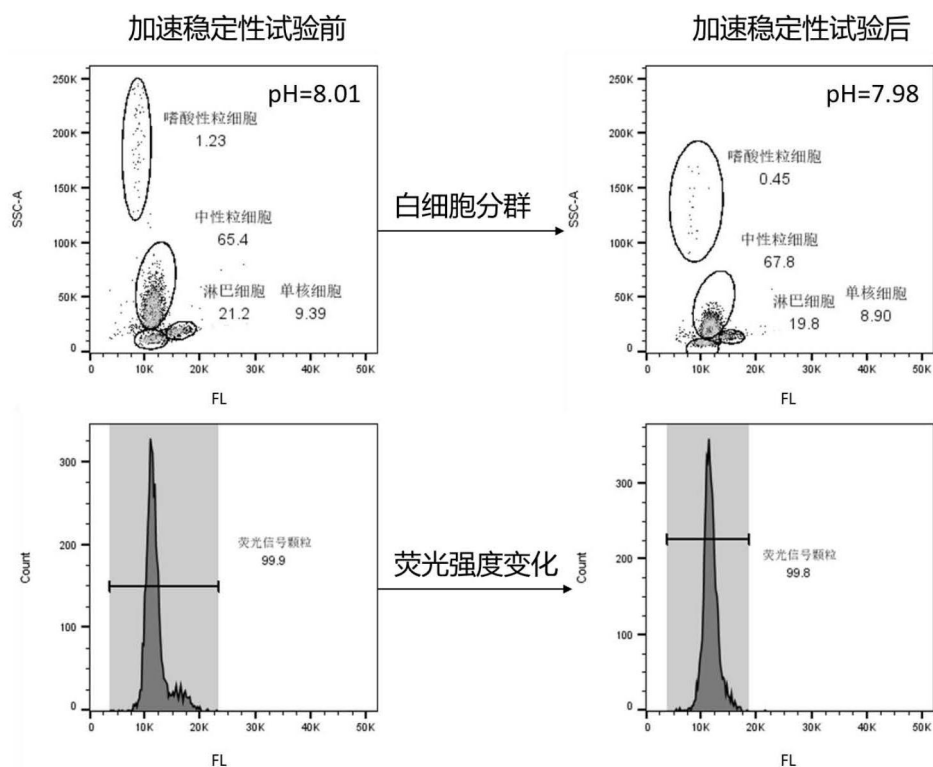


图4

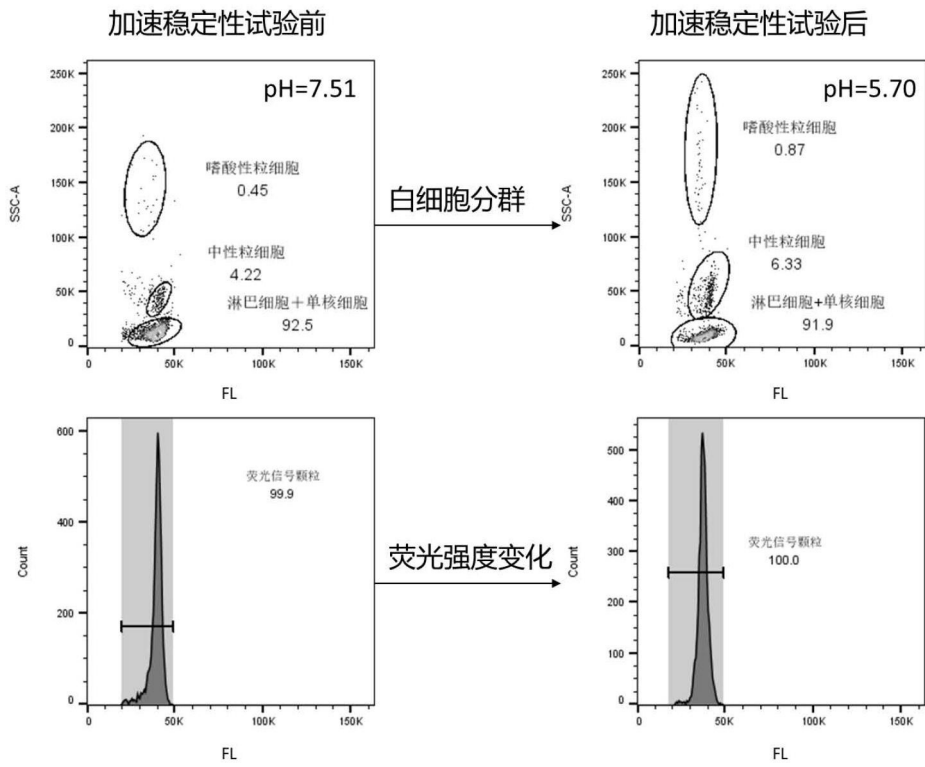


图5

加速稳定性试验前

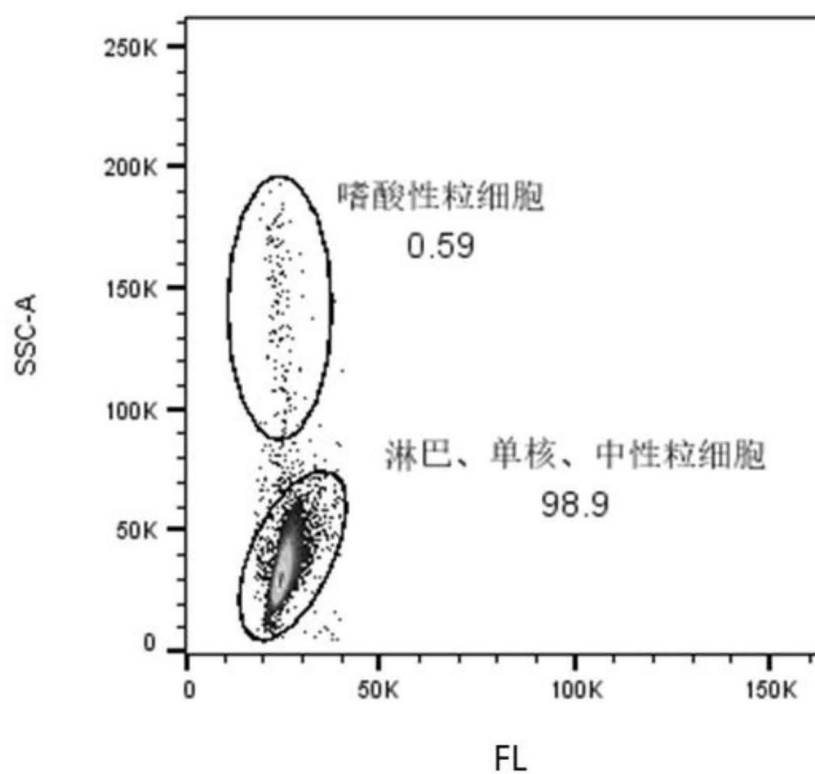


图6

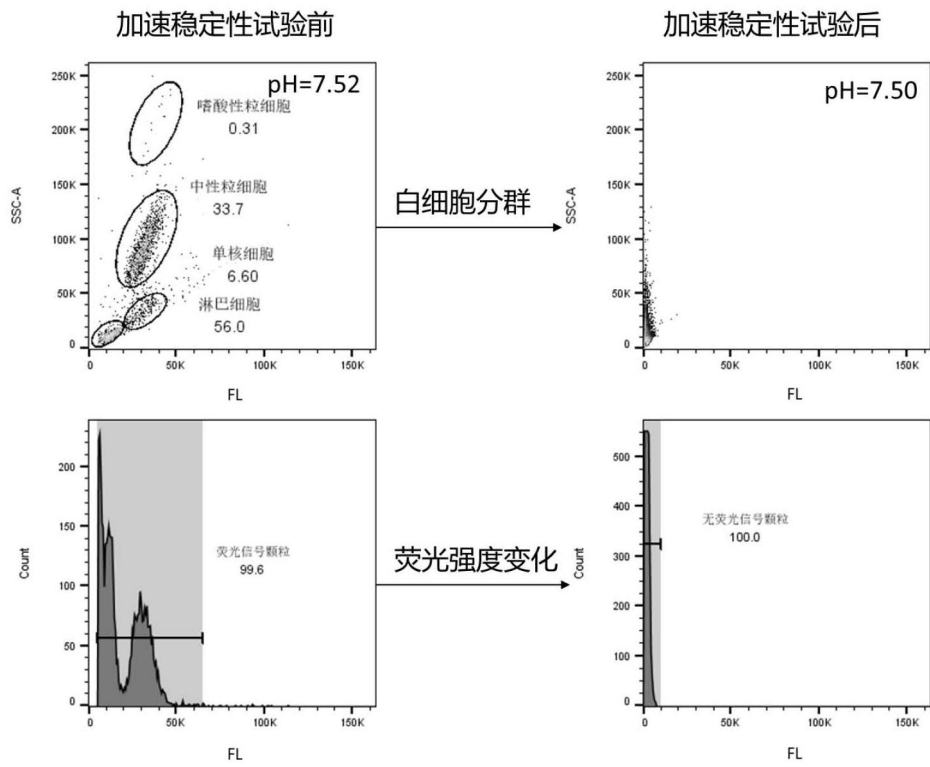


图7