



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119757168 A

(43) 申请公布日 2025.04.04

(21) 申请号 202411637486.X

G01N 33/58 (2006.01)

(22) 申请日 2024.11.15

(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

专利代理人 江裕强 刘远

(51) Int.Cl.

G01N 15/1409 (2024.01)

G01N 15/149 (2024.01)

G01N 33/569 (2006.01)

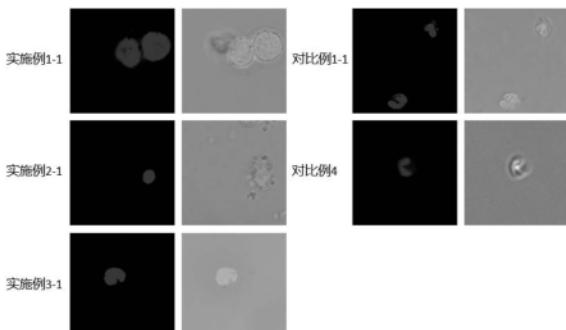
权利要求书4页 说明书13页 附图4页

(54) 发明名称

一种白细胞分类检测用溶血剂和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种白细胞分类检测用溶血剂和应用；本发明的白细胞分类检测用溶血剂包括表面活性剂、有机酸和水；所述有机酸选自芳香族有机酸及其衍生物中的任意一种或多种；所述表面活性剂为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂复配，或者非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂复配，或者非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配。本发明的溶血剂可以与AIE荧光染料混合使用，不会产生干扰或相互作用，能够高效裂解红细胞，同时最大程度地保留白细胞的形态特征和内部结构，且对白细胞DNA的响应灵敏度高，实现白细胞细胞核特异性标记，有效提高白细胞分类检测中对血液样本的处理效率，以及保证样本处理的可靠性和检测结果的准确性。



1. 一种白细胞分类检测用溶血剂,其特征在于,包括表面活性剂、有机酸和水;
所述有机酸选自芳香族有机酸及其衍生物中的任意一种或多种;
所述表面活性剂为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂复配,或者非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂复配,或者非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配;
当表面活性剂为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂复配时,表面活性剂的总摩尔浓度为1-20mM,其中,非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂的摩尔比为0.05-4;有机酸的摩尔浓度为2-10mM;所述溶血剂的pH为6.5-8.0;
当表面活性剂为非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂复配时,表面活性剂的总摩尔浓度为1-10mM,其中,非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂的摩尔比为0.1-1;有机酸的摩尔浓度为2-10mM;所述溶血剂的pH为6.5-8.0;
当表面活性剂为非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配时,表面活性剂的总摩尔浓度为1-3.5mM,其中,非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂的摩尔比为0.3-1.5;有机酸的摩尔浓度为30-50mM;所述溶血剂的pH为6.5-8.0。
2. 根据权利要求1所述的白细胞分类检测用溶血剂,其特征在于,所述有机酸选自水杨酸及其盐类衍生物、咖啡酸及其盐类衍生物、邻苯二甲酸及其盐类衍生物中的任意一种或多种;
所述非离子表面活性剂选自聚氧乙烯类表面活性剂、烷基醇酰胺类表面活性剂、聚乙二醇类表面活性剂中的任意一种或多种;
所述阴离子表面活性剂选自磺酸盐类表面活性剂、硫酸盐类表面活性剂中的任意一种或多种;
所述两性离子表面活性剂选自氨基酸类表面活性剂、甜菜碱类表面活性剂中的任意一种或多种;
所述阳离子表面活性剂选自铵盐类表面活性剂中的任意一种或多种。
3. 根据权利要求2所述的白细胞分类检测用溶血剂,其特征在于,所述聚氧乙烯类表面活性剂选自聚氧乙烯月桂醚-35、聚氧乙烯(20)油醚、脂肪醇聚氧乙烯醚-50、吐温中的任意一种或多种;
所述烷基醇酰胺类表面活性剂选自椰油酸二乙醇酰胺、月桂酸二乙醇酰胺、肉豆蔻基二乙醇酰胺中的任意一种或多种;
所述聚乙二醇类表面活性剂选自聚乙二醇-4000、聚乙二醇-6000、聚乙二醇-8000中的任意一种或多种;
所述磺酸盐类表面活性剂选自十二烷基磺酸钠、十二烷基苯磺酸钠、脂肪醇聚氧乙烯醚磺酸钠中的任意一种或多种;
所述硫酸盐类表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钾、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸钠中的至少一种或多种;
所述氨基酸类表面活性剂选自椰油酰肌氨酸钠、N-月桂酰肌氨酸钠、十二烷基谷氨酸钠和棕榈油酰谷氨酸钠中的任意一种或多种;
所述甜菜碱类表面活性剂选自甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱、月桂酰胺丙基甜菜碱中的任意一种或多种;
所述铵盐类表面活性剂包括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、羟乙基月桂基二甲基氯化铵中的任意一种或多种。

4. 根据权利要求1所述的白细胞分类检测用溶血剂,其特征在于,当表面活性剂为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂复配时,非离子表面活性剂选自聚氧乙烯月桂醚-35,阴离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠,有机酸选自邻苯二甲酸或其盐类衍生物;

当表面活性剂为非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂复配时,非离子表面活性剂选自脂肪醇聚氧乙烯醚-50,两性离子表面活性剂选自N-月桂酰肌氨酸钠,有机酸选自邻苯二甲酸或其盐类衍生物;

当表面活性剂为非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配时,非离子表面活性剂选自聚氧乙烯月桂醚-35,阳离子表面活性剂选自十二烷基三甲基氯化铵;有机酸选自邻苯二甲酸或其盐类衍生物。

5. 根据权利要求1所述的白细胞分类检测用溶血剂,其特征在于,当表面活性剂为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂复配时,所述溶血剂的pH为7.2-7.6;

当表面活性剂为非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂复配时,所述溶血剂的pH为7.2-7.6;

当表面活性剂为非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配时,所述溶血剂的pH为7.2-7.6;

当表面活性剂为非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配时,非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂的摩尔比为0.8-1.2。

6. 权利要求1-5任一项所述的白细胞分类检测用溶血剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

按照配比将有机酸和表面活性剂用水完全溶解,调节至要求pH,得到白细胞分类检测用溶血剂。

7. 一种白细胞分类检测试剂,其特征在于,包括权利要求1-5任一项所述的白细胞分类检测用溶血剂和AIE白细胞分类染色液。

8. 权利要求1-5任一项所述的白细胞分类检测用溶血剂或权利要求7所述的白细胞分类检测试剂在非疾病诊断领域白细胞分类和/或计数检测中的应用。

9. 一种白细胞分类检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

将权利要求1-5任一项所述的白细胞分类检测用溶血剂与AIE白细胞分类染色液充分混合,得到混合物溶液,加入血液样本充分混合,制得样品待测液,然后用流式细胞仪进行白细胞分类和/或计数检测。

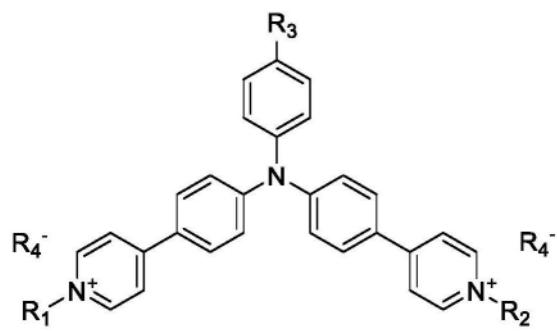
10. 根据权利要求9所述的白细胞分类检测方法,其特征在于,所述白细胞分类检测用溶血剂与AIE白细胞分类染色液的体积用量比例为1000:(1~3);

所述AIE白细胞分类染色液的浓度为5-20mM;

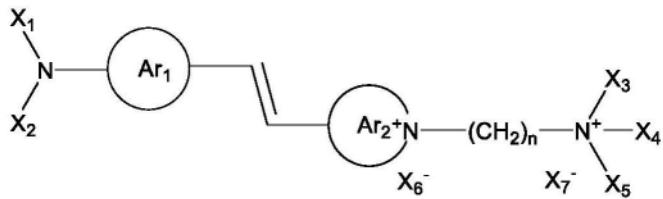
所述血液样本与混合物溶液的用量比例为10~30μL:1mL;

所述血液样本加入混合物溶液后,充分混合30-90s;

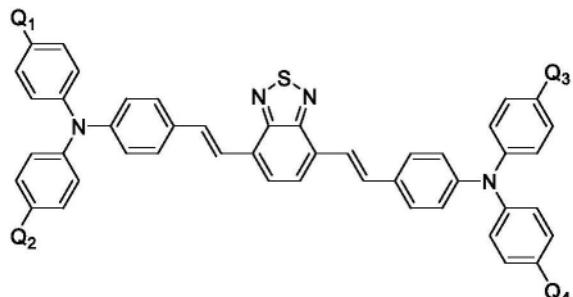
所述AIE白细胞分类染色液包括式(1)到式(4)中任意一种结构的AIE荧光染料;



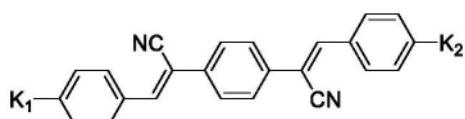
(1)



(2)

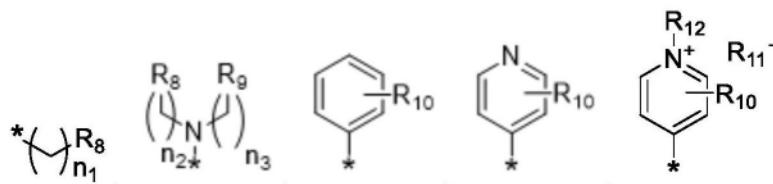


(3)

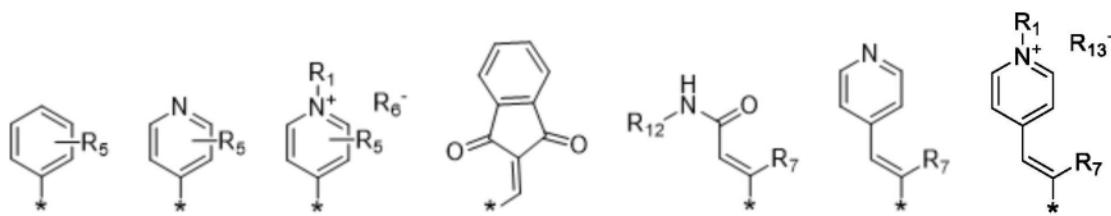


(4)

式(1)中, R_1 、 R_2 各自独立选自以下结构中的一种:

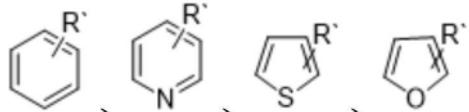


R_3 选自以下结构中的一种:

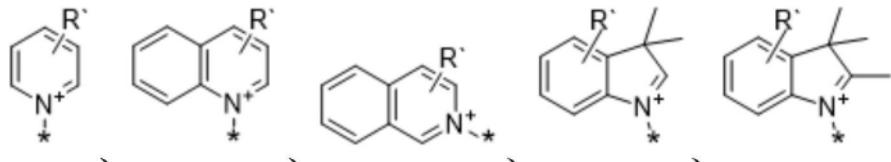


R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{12} 各自独立选自-H、-CH₃、-COOH、-OH、-NH₂、-CHO、-CN中的一种; n_1 、 n_2 、 n_3 为大于等于1的整数;

R_5 为H或者选自 R_1 结构中的一种；
 R_7 为-H、-CN、-CH₃中的一种；
 R_4^- 、 R_6^- 、 R_{11}^- 、 R_{13}^- 为一价阴离子；
式(2)中, Ar_1 选自以下结构中的一种：



Ar_2 选自以下结构中的一种：



R' 为相同或者不同的、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链、支链或者环状烷基链；

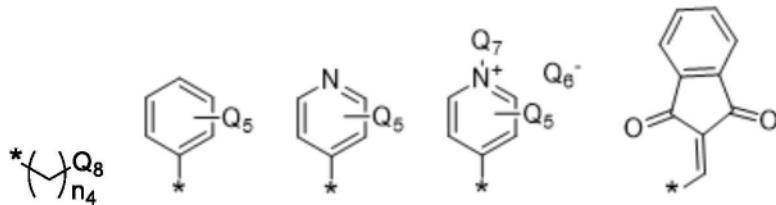
X_1 、 X_2 为相同或者不同的、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链、支链或者环状烷基链；

X_3 、 X_4 、 X_5 为相同或者不同的、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链、支链或者环状烷基链；

n 为大于等于1的整数；

X_6^- 、 X_7^- 为一价阴离子；

式(3)中, Q_1 、 Q_2 、 Q_3 、 Q_4 各自独立选自以下结构中的一种：

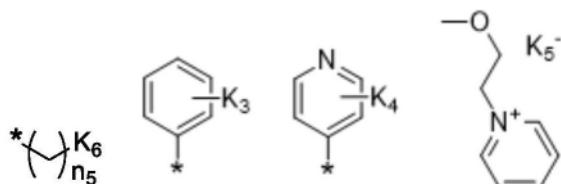


Q_5 、 Q_7 、 Q_8 各自独立选自-H、-CH₃、-COOH、-OH、-NH₂、-CHO、-CN中的一种；

n_4 为大于等于1的整数；

Q_6^- 为一价阴离子；

式(4)中, K_1 、 K_2 各自独立选自以下结构中的一种：



K_3 、 K_4 、 K_6 各自独立选自-H、-CH₃、-COOH、-OH、-NH₂、-CHO、-CN中的一种；

K_5^- 为一价阴离子；

n_5 为大于等于1的整数；

其中,*表示取代位置。

一种白细胞分类检测用溶血剂和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及白细胞分类检测技术领域,具体涉及一种白细胞分类检测用溶血剂和应用。

背景技术

[0002] 外周血的主要成分是白细胞、红细胞和血小板,白细胞由五种细胞组成,分别是中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞。血液中各种白细胞的比例和数量都在一个稳定的范围内波动,人患病时白细胞的数量和比例会发生不同程度的变化,通过监测其变化情况可以为临床诊断提供有价值的信息。故在血常规检测领域,白细胞分类的准确性对于疾病的快速确诊与精准治疗至关重要。

[0003] 目前对于血液中白细胞的分类检测大多采用血液细胞分析仪,该检测方法要使用溶血剂和核酸染料对样本进行预处理。溶血剂的作用是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] 样本处理是一个关键环节,直接影响到检测结果的准确性和可靠性。传统的血液样本处理方式,主要是先采用溶血剂与血液样本混合处理一定时间,再加入核酸染料进行染色制得待测试样,将待测试样导入血液分析仪进行分类和计数分析。这种分步处理方式需要控制第一步溶血剂与血液样本混合处理时间(处理时间过短,溶血剂与血液样本未充分反应,影响后续的染色效果,导致白细胞分类计数不准确;处理时间过长,可能会对白细胞造成过度破坏,影响白细胞活性,而导致白细胞分类计数不准确),故该方式在实际操作中较为繁琐,尤其是当样本数量较多时,检验人员处理效率难以提高,且可能会增加操作不当而引入误差的概率。中国专利申请CN103460041A公开了一种白细胞分类试剂,可以将溶血剂和染色试剂先混合,然后再加入血液样本中制得待测试样,其简化了操作步骤,能够有效提高样本处理效率及保证样本处理可靠性。但这种样本处理方式要求溶血剂与染色试剂具有较好的适配性,在混合后体系有较好的稳定性且不影响溶血作用和染色作用,难以适用其他现有的溶血剂与染色试剂。

[0005] 中国专利CN117233067B公开了一种用于白细胞检测的AIE荧光染料,具有检测灵敏性高、光稳定性好、单次使用剂量低、不易发生荧光猝灭现象等特点,在白细胞分类检测中具有很大的应用优势。然而现有的溶血剂与该AIE荧光染料适配性较低,对于样本处理仍然需要采用传统的“先将溶血剂与血液样本混合处理一定时间,再加入核酸染料进行染色”的分步处理方式,一定程度限制了该AIE荧光染料的市场竞争力。因此,开发一种适配AIE荧光染料的溶血剂,简化血液样本处理的操作步骤,对于拓宽AIE荧光染料在白细胞分类检测领域的应用具有重要意义。

发明内容

[0006] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的是提供一种白细胞分类检测用溶血剂和应用;本发明的白细胞分类检测用溶血剂与AIE荧光染料(特别是中国专利CN117233067B中所述的AIE荧光染料)高度适配,可以与AIE荧光染料混合使用,能够高效裂解红细胞,同时最大程度地保留白细胞的形态特征和内部结构,且对白细胞DNA的响应灵敏度高,实现白细胞细胞核特异性标记,有效提高白细胞分类检测中对血液样本的处理效率,以及保证样本处理的可靠性,获得准确的检测结果。

[0007] 本发明的技术方案如下:

[0008] 本发明提供一种白细胞分类检测用溶血剂,包括表面活性剂、有机酸和水;

[0009] 所述有机酸选自芳香族有机酸及其衍生物中的任意一种或多种;

[0010] 所述表面活性剂为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂复配,或者非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂复配,或者非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配;

[0011] 当表面活性剂为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂复配时,表面活性剂的总摩尔浓度为1-20mM,其中,非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂的摩尔比为0.05-4;有机酸的摩尔浓度为2-10mM;所述溶血剂的pH为6.5-8.0;

[0012] 当表面活性剂为非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂复配时,表面活性剂的总摩尔浓度为1-10mM,其中,非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂的摩尔比为0.1-1;有机酸的摩尔浓度为2-10mM;所述溶血剂的pH为6.5-8.0;

[0013] 当表面活性剂为非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配时,表面活性剂的总摩尔浓度为1-3.5mM,其中,非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂的摩尔比为0.3-1.5;有机酸的摩尔浓度为30-50mM;所述溶血剂的pH为6.5-8.0。

[0014] 优选的,所述有机酸选自水杨酸及其盐类衍生物、咖啡酸及其盐类衍生物、邻苯二甲酸及其盐类衍生物中的任意一种或多种;

[0015] 优选的,所述非离子表面活性剂选自聚氧乙烯类表面活性剂、烷基醇酰胺类表面活性剂、聚乙二醇类表面活性剂中的任意一种或多种;

[0016] 进一步优选的,所述聚氧乙烯类表面活性剂选自聚氧乙烯月桂醚-35(简写Brij35)、聚氧乙烯(20)油醚(简写Brij020)、脂肪醇聚氧乙烯醚-50(简写050)、吐温中的任意一种或多种;

[0017] 进一步优选的,所述烷基醇酰胺类表面活性剂选自椰油酸二乙醇酰胺、月桂酸二乙醇酰胺、肉豆蔻基二乙醇酰胺中的任意一种或多种;

[0018] 进一步优选的,所述聚乙二醇类表面活性剂选自聚乙二醇-4000、聚乙二醇-6000、聚乙二醇-8000中的任意一种或多种;

[0019] 优选的,所述阴离子表面活性剂选自磺酸盐类表面活性剂、硫酸盐类表面活性剂中的任意一种或多种;

[0020] 进一步优选的,所述磺酸盐类表面活性剂选自十二烷基磺酸钠、十二烷基苯磺酸钠、脂肪醇聚氧乙烯醚磺酸钠中的任意一种或多种;

[0021] 进一步优选的,所述硫酸盐类表面活性剂选自十二烷基硫酸钠(简写SDS)、十二烷基硫酸钾、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸钠中的至少一种或多种;

[0022] 优选的,所述两性离子表面活性剂选自氨基酸类表面活性剂、甜菜碱类活性

剂中的任意一种或多种；

[0023] 进一步优选的，所述氨基酸类表面活性剂选自椰油酰肌氨酸钠、N-月桂酰肌氨酸钠、十二烷基谷氨酸钠和棕榈油酰谷氨酸钠中的任意一种或多种；

[0024] 进一步优选的，所述甜菜碱类表面活性剂选自甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱、月桂酰胺丙基甜菜碱中的任意一种或多种；

[0025] 优选的，所述阳离子表面活性剂选自铵盐类表面活性剂中的任意一种或多种。

[0026] 进一步优选的，所述铵盐类表面活性剂包括十二烷基三甲基氯化铵(LTAC)、十四烷基三甲基氯化铵(TTAC)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、羟乙基月桂基二甲基氯化铵中的任意一种或多种。

[0027] 优选的，当表面活性剂为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂复配时，非离子表面活性剂选自聚氧乙烯月桂醚-35(简写Brij35)，阴离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠(简写SDS)，有机酸选自邻苯二甲酸或其盐类衍生物；

[0028] 优选的，当表面活性剂为非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂复配时，非离子表面活性剂选自脂肪醇聚氧乙烯醚-50(简写O50)，两性离子表面活性剂选自N-月桂酰肌氨酸钠，有机酸选自邻苯二甲酸或其盐类衍生物；

[0029] 优选的，当表面活性剂为非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配时，非离子表面活性剂选自聚氧乙烯月桂醚-35(简写Brij35)，阳离子表面活性剂选自十二烷基三甲基氯化铵(LTAC)；有机酸选自邻苯二甲酸或其盐类衍生物。

[0030] 优选的，当表面活性剂为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂复配时，所述溶血剂的pH为7.2-7.6；

[0031] 优选的，当表面活性剂为非离子表面活性剂和两性离子表面活性剂复配时，所述溶血剂的pH为7.2-7.6

[0032] 优选的，当表面活性剂为非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配时，所述溶血剂的pH为7.2-7.6；

[0033] 优选的，当表面活性剂为非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂复配时，非离子表面活性剂和阳离子表面活性剂的摩尔比为0.8-1.2。

[0034] 本发明提供一种上述的白细胞分类检测用溶血剂的制备方法，包括以下步骤：

[0035] 按照配比将有机酸和表面活性剂用水完全溶解，调节至要求pH，得到白细胞分类检测用溶血剂。

[0036] 优选的，用盐酸溶液或氢氧化钠溶液调节至要求pH。

[0037] 本发明提供一种白细胞分类检测试剂，包括上述的白细胞分类检测用溶血剂和AIE白细胞分类染色液。

[0038] 本发明提供一种上述的白细胞分类检测用溶血剂或上述的白细胞分类检测试剂在非疾病诊断领域白细胞分类和/或计数检测中的应用。

[0039] 本发明提供一种白细胞分类检测方法，包括以下步骤：

[0040] 将上述的白细胞分类检测用溶血剂与AIE白细胞分类染色液充分混合，得到混合物溶液，加入血液样本充分混合，制得样品待测液，然后用流式细胞仪进行白细胞分类和/或计数检测。

[0041] 优选的，所述白细胞分类检测用溶血剂与AIE白细胞分类染色液的体积用量比例

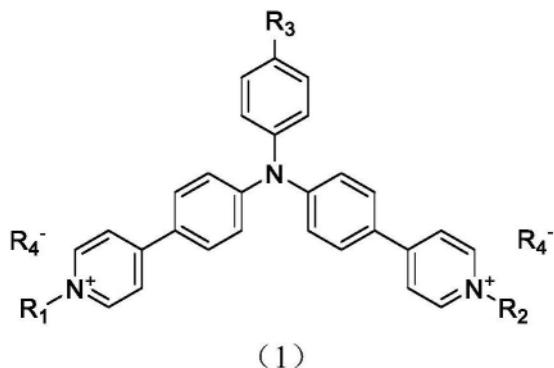
为1000:(1~3);

[0042] 优选的,所述AIE白细胞分类染色液的浓度为5~20mM;

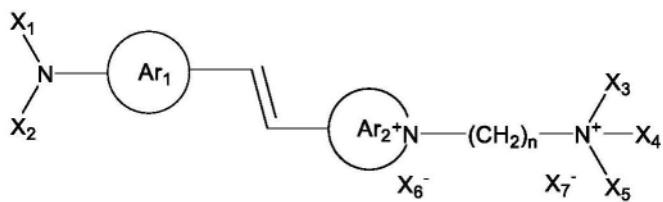
[0043] 优选的,所述血液样本与混合物溶液的用量比例为10~30μL:1mL;

[0044] 优选的,所述血液样本加入混合物溶液后,充分混合30~90s。

[0045] 优选的,所述AIE白细胞分类染色液包括式(1)到式(4)中任意一种结构的AIE荧光染料;

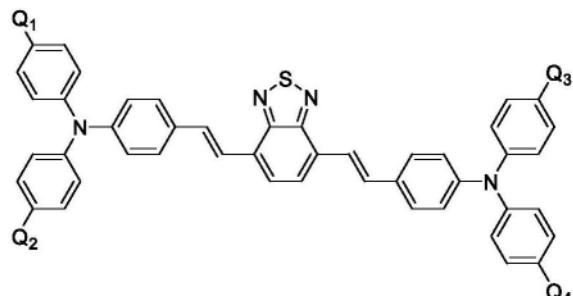


(1)

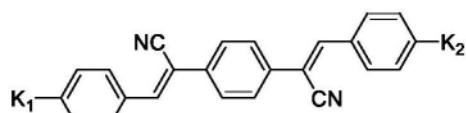


[0046]

(2)

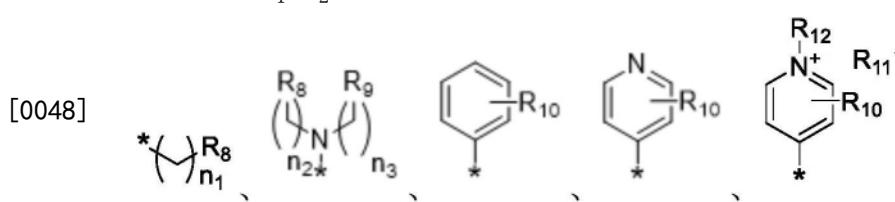


(3)

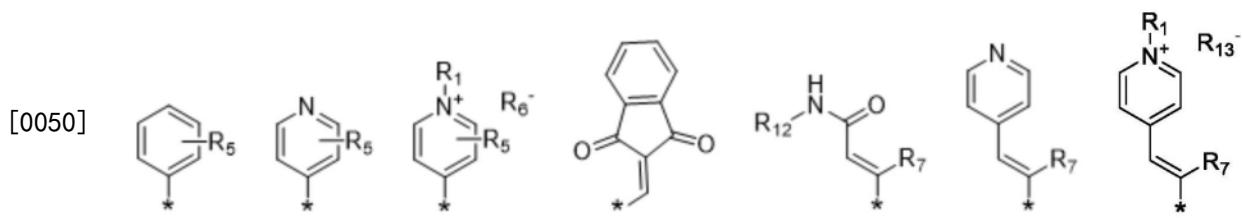


(4)

[0047] 式(1)中,R₁、R₂各自独立选自以下结构中的一种:



[0049] R₃选自以下结构中的一种:



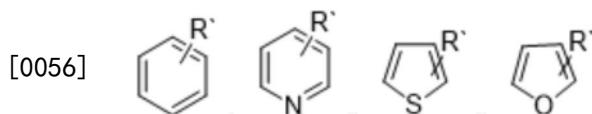
[0051] R_8, R_9, R_{10}, R_{12} 各自独立选自 $-H, -CH_3, -COOH, -OH, -NH_2, -CHO, -CN$ 中的一种; n_1, n_2, n_3 为大于等于1的整数;

[0052] R_5 为H或者选自 R_1 结构中的一种;

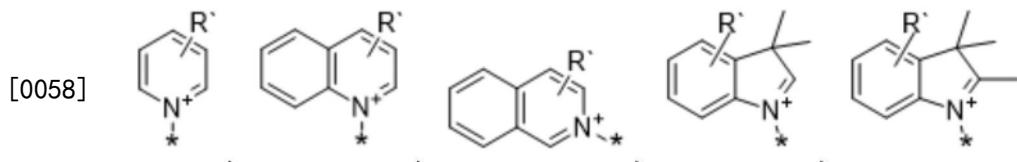
[0053] R_7 为 $-H, -CN, -CH_3$ 中的一种;

[0054] $R_4^-, R_6^-, R_{11}^-, R_{13}^-$ 为一价阴离子;

[0055] 式(2)中, Ar_1 选自以下结构中的一种:



[0057] Ar_2 选自以下结构中的一种:



[0059] R^- 为相同或者不同的、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链、支链或者环状烷基链;

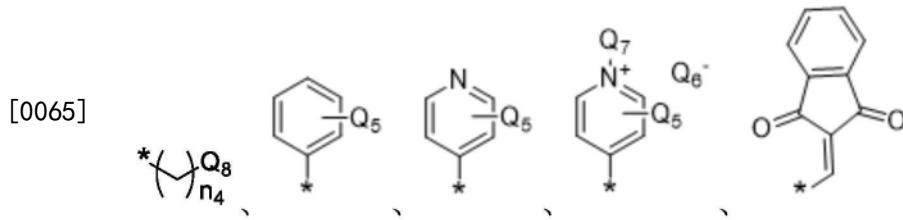
[0060] X_1, X_2 为相同或者不同的、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链、支链或者环状烷基链;

[0061] X_3, X_4, X_5 为相同或者不同的、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链、支链或者环状烷基链;

[0062] n 为大于等于1的整数;

[0063] X_6^-, X_7^- 为一价阴离子;

[0064] 式(3)中, Q_1, Q_2, Q_3, Q_4 各自独立选自以下结构中的一种:



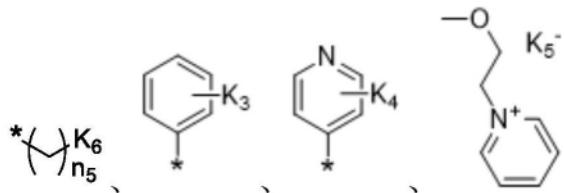
[0066] Q_5, Q_7, Q_8 各自独立选自 $-H, -CH_3, -COOH, -OH, -NH_2, -CHO, -CN$ 中的一种;

[0067] n_4 为大于等于1的整数;

[0068] Q_6^- 为一价阴离子;

[0069] 式(4)中, K_1, K_2 各自独立选自以下结构中的一种:

[0070]



[0071] K_3, K_4, K_6 各自独立选自-H、-CH₃、-COOH、-OH、-NH₂、-CHO、-CN中的一种；

[0072] K_5^- 为一价阴离子；

[0073] n_5 为大于等于1的整数；

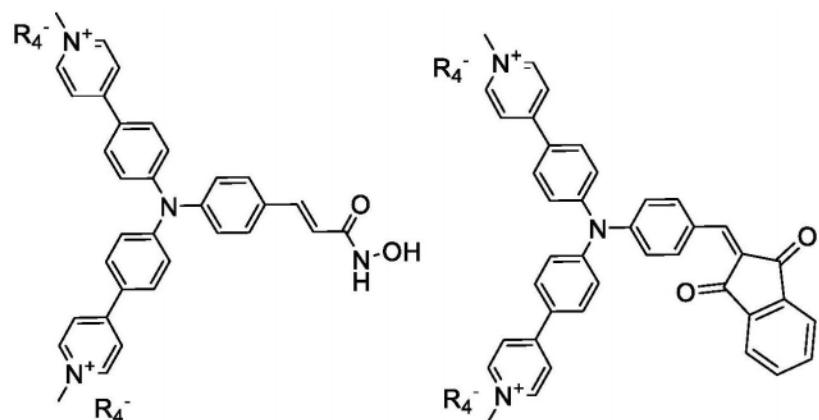
[0074] 其中,*表示取代位置。

[0075] 进一步优选的,所述一价阴离子选自F⁻、Cl⁻、Br⁻、I⁻、NO₂⁻、NO₃⁻、BF₄⁻、PF₆⁻、SbF₆⁻、CF₃SO₃⁻、ClO₄⁻中的一种。

[0076] 进一步优选的, $n, n_1, n_2, n_3, n_4, n_5$ 为1-20的整数(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20)；

[0077] 进一步优选的,取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链、支链或者环状烷基链中的取代基为卤素、羟基、羧基、氨基、醛基、氰基。

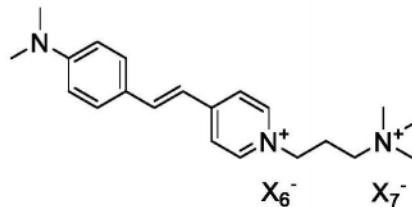
[0078] 进一步优选的,所述AIE分子的结构式为化学式I-化学式V中的一种；



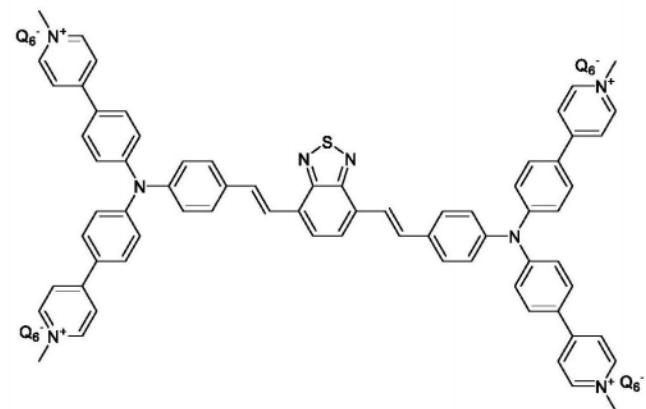
化学式 I

化学式 II

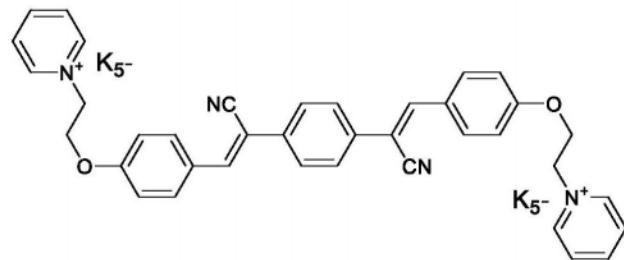
[0079]



化学式 III



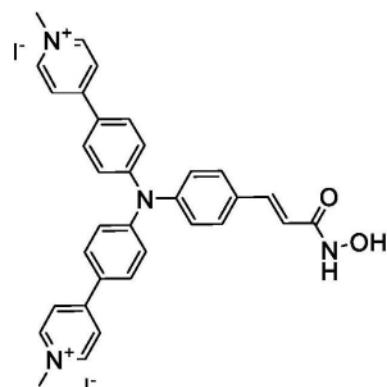
化学式 IV



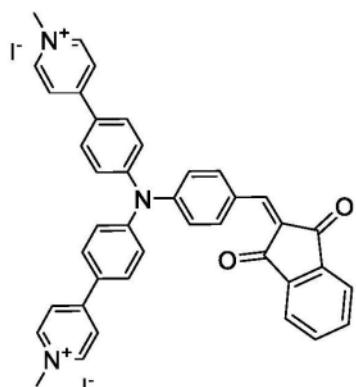
化学式 V

[0080] R_4^- 、 X_6^- 、 X_7^- 、 Q_6^- 、 K_5^- 为一价阴离子。

[0081] 进一步优选的,所述AIE分子的结构式为如下化学式I-化学式V中的一种;

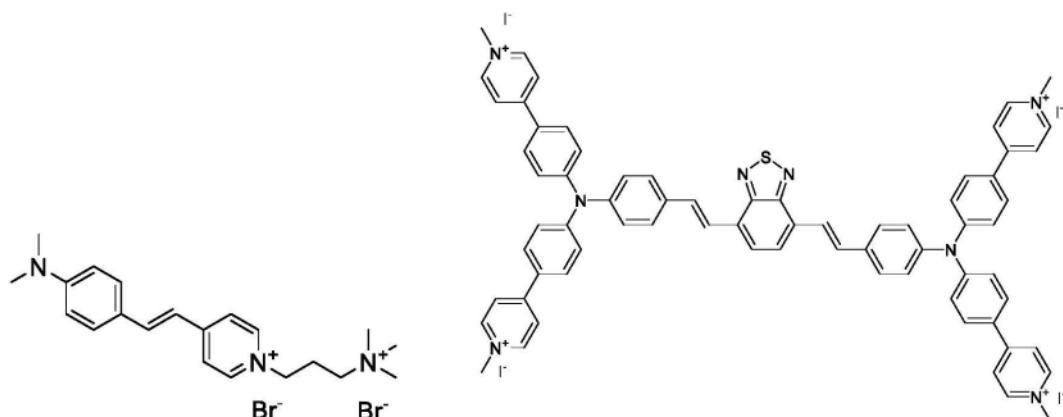


化学式 I

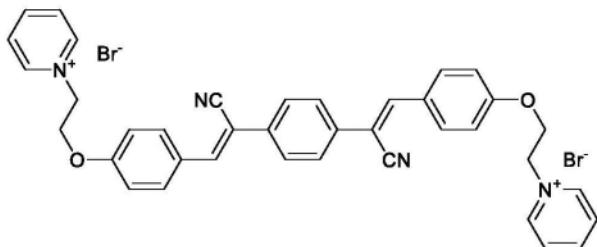


化学式 II

[0082]



化学式 III



化学式 V

[0083] 与现有技术相比,本发明的优点和有益效果如下:

[0084] 本发明的溶血剂,与AIE荧光染料(特别是中国专利CN117233067B中所述的AIE荧光染料)高度适配,可以与AIE荧光染料混合使用,在混合使用过程中不会产生干扰或相互作用,能够高效裂解红细胞,同时最大程度地保留白细胞的形态特征和内部结构,且对白细胞DNA的响应灵敏度高,实现白细胞细胞核特异性标记,有效提高白细胞分类检测中对血液样本的处理效率,以及保证样本处理的可靠性和检测结果的准确性。

[0085] 本发明的溶血剂在用于白细胞分类检测时,可将其先与AIE荧光染料混合,然后再加入血液样本制得待测试样,大大简化了操作步骤,且显著缩短了样本处理时间,在样本数量较多时容易实现程序化处理,有效提高白细胞检测效率,降低了操作难度和成本。本发明溶血剂的开发,有利于拓宽AIE荧光染料在白细胞分类检测领域的应用。

附图说明

[0086] 图1是实施例1-1、实施例2-1、实施例3-1、对比例1-1、对比例4的溶血剂和AIE白细胞分类染色液处理样本后的白细胞荧光成像效果图。

[0087] 图2至4是实施例和对比例的溶血剂和AIE白细胞分类染色液处理样本后的白细胞分类效果图。

具体实施方式

[0088] 下面结合实施例,对本发明作进一步详细说明,但本发明的实施方式不限于此。

[0089] 以下实施例和对比例中的制备溶血剂的方法如下:

[0090] 按照配比分别称量有机酸和表面活性剂,用水完全溶解后,采用盐酸溶液或氢氧化钠溶液调节至要求pH。

[0091] 实施例1:

[0092] 按照表1制备溶血剂。



[0093] 取1μL 10mM AIE白细胞分类染色液(AIE分子为

无水DMSO)加入1mL溶血剂,充分混合,得到含有染色液的溶血剂混合物;取20μL新鲜EDTA-K2抗凝血液,加入1mL含有染色液的溶血剂混合物,充分混合30-60秒,得到样品待测液。

[0094] 表1

	实施例 1-1	实施例 1-2	实施例 1-3
	Brij35 1.5mM 聚氧乙烯月桂醚-35	Brij35 1mM 聚氧乙烯月桂醚-35	Brij35 1mM 聚氧乙烯月桂醚-35
	LTAC 1.5mM 十二烷基三甲基氯化铵	LTAC 2mM 十二烷基三甲基氯化铵	LTAC 2mM 十二烷基三甲基氯化铵
	邻苯二甲酸 40mM	邻苯二甲酸 40mM	邻苯二甲酸 40mM
	水 1L	水 1L	水 1L
	非离子/阳离子表面活性剂摩尔浓度比 1	非离子/阳离子表面活性剂摩尔浓度比 0.5	非离子/阳离子表面活性剂摩尔浓度比 0.5
	pH=7.5	pH=7.5	pH=7.0

[0096] 实施例2:

[0097] 按照表2制备溶血剂。



[0098] 取1μl 10mM AIE白细胞分类染色液(AIE分子为

无水DMSO)加入1mL溶血剂,充分混合,得到含有染色液的溶血剂混合物;取20μl新鲜EDTA-K2抗凝血液,加入1mL含有染色液的溶血剂混合物,充分混合30-60秒,得到样品待测液。

[0099] 表2

	实施例 2-1	实施例 2-2	实施例 2-3
	Brij35 1mM 聚氧乙烯月桂醚-35	BrijO20 2mM 聚氧乙烯(20)油醚	O50 2mM 脂肪醇聚氧乙烯醚-50
	SDS 0.25mM 十二烷基硫酸钠	十二烷基苯磺酸钠 4mM	十二烷基硫酸钾 8mM
	邻苯二甲酸钠 6mM	水杨酸钠 6mM	咖啡酸钠 6mM
	水 1L	水 1L	水 1L
	非离子/阴离子表面活性剂摩尔浓度比 4	非离子/阴离子表面活性剂摩尔浓度比 0.5	非离子/阴离子表面活性剂摩尔浓度比 0.25
	pH=7.5	pH=7.5	pH=6.5

[0101] 实施例3：

[0102] 按照表3制备溶血剂。

[0103] 取1μl 10mM AIE白细胞分类染色液 (AIE分子为 溶剂为

无水DMSO)加入1mL溶血剂,充分混合,得到含有染色液的溶血剂混合物;取20 μ l新鲜EDTA-K2抗凝血液,加入1mL含有染色液的溶血剂混合物,充分混合30-60秒,得到样品待测液。

[0104] 表3

	实施例 3-1	实施例 3-2	实施例 3-3
	O50 1.5mM 脂肪醇聚氧乙烯醚-50	BrijO20 1.5mM 聚氧乙烯(20)油醚	Brij35 0.5mM 聚氧乙烯月桂醚-35
	N-月桂酰肌氨酸钠 8mM	甜菜碱 4mM	十二烷基谷氨酸钠 5mM
	邻苯二甲酸钠 5mM	水杨酸钠 5mM	咖啡酸钠 10mM
	水 1L	水 1L	水 1L
[0105]	非离子/两性离子表面活性剂 摩尔浓度比 0.19	非离子//两性离子表面活性剂 摩尔浓度比 0.38	非离子//两性离子表面活性剂 摩尔浓度比 0.1
	pH=7.5	pH=7.5	pH=6.5

[0106] 对比例1：

[0107] 按照表4制备实施例溶血剂。

无水DMSO)加入1ml溶血剂,充分混合,得到含有染色液的溶血剂混合物;取20 μ l新鲜EDTA-K2抗凝血液,加入1ml含有染色液的溶血剂混合物,充分混合30-60秒,得到样品待测液。

[0109] 表4

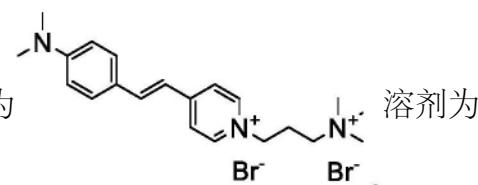
[0110]

对比例 1-1	对比例 1-2	对比例 1-3	对比例 1-4
Brij35 1mM 聚氧乙烯月桂醚-35	Brij35 0.5mM 聚氧乙烯月桂醚-35	Brij35 2.5mM 聚氧乙烯月桂醚-35	Brij35 1.5mM 聚氧乙烯月桂醚-35
LTAC 2mM 十二烷基三甲基氯化铵	LTAC 2.5mM 十二烷基三甲基氯化铵	LTAC 0.5mM 十二烷基三甲基氯化铵	LTAC 3mM 十二烷基三甲基氯化铵
邻苯二甲酸 40mM	邻苯二甲酸 40mM	邻苯二甲酸 40mM	邻苯二甲酸 40mM
水 1L	水 1L	水 1L	水 1L
非离子/阳离子表面活性剂摩尔浓度比 0.5	非离子/阳离子表面活性剂摩尔浓度比 0.2	非离子/阳离子表面活性剂摩尔浓度比 5	非离子/阳离子表面活性剂摩尔浓度比 0.5
pH=6.0	pH=7.5	pH=7.5	pH=7.5

[0111] 对比例2：

[0112] 按照表5和表6制备实施例溶血剂。

[0113] 取1μl 10mM AIE白细胞分类染色液 (AIE分子为



溶剂为

无水DMSO) 加入1ml溶血剂,充分混合,得到含有染色液的溶血剂混合物;取20μl新鲜EDTA-K2抗凝血液,加入1ml含有染色液的溶血剂混合物,充分混合30-60秒,得到样品待测液。

[0114] 表5

[0115]

对比例 2-1	对比例 2-2	对比例 2-3
Brij35 1mM 聚氧乙烯月桂醚-35	Brij35 1.1mM 聚氧乙烯月桂醚-35	Brij35 18mM 聚氧乙烯月桂醚-35
SDS 0.25mM 十二烷基硫酸钠	SDS 0.15mM 十二烷基硫酸钠	SDS 4.5mM 十二烷基硫酸钠

[0116]

邻苯二甲酸钠 6mM 水 1L 非离子/阴离子表面活性剂摩尔浓度比 4 pH=5.5	邻苯二甲酸钠 6mM 水 1L 非离子/阴离子表面活性剂摩尔浓度比 7.3 pH=7.5	邻苯二甲酸钠 6mM 水 1L 非离子/阴离子表面活性剂摩尔浓度比 4 pH=7.5

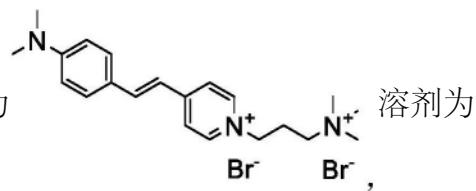
[0117] 表6

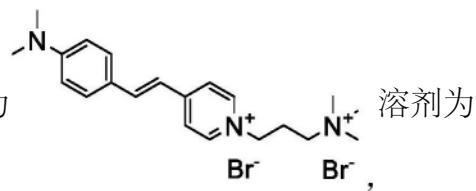
[0118]

对比例 2-4	对比例 2-5
Brij35 1mM 聚氧乙烯月桂醚-35	Brij35 1mM 聚氧乙烯月桂醚-35
SDS 0.25mM 十二烷基硫酸钠	SDS 0.25mM 十二烷基硫酸钠
邻苯二甲酸钠 15mM 水 1L 非离子/阴离子表面活性剂摩尔浓度比 4 pH=7.5	柠檬酸钠 6mM 水 1L 非离子/阴离子表面活性剂摩尔浓度比 4 pH=7.5

[0119] 对比例3：

[0120] 按照表7和表8制备实施例溶血剂。



[0121] 取1μl 10mM AIE白细胞分类染色液 (AIE分子为  溶剂为 $\text{Br}^- \text{ Br}^-$)，

无水DMSO) 加入1ml溶血剂,充分混合,得到含有染色液的溶血剂混合物;取20μl新鲜EDTA-K2抗凝血液,加入1ml含有染色液的溶血剂混合物,充分混合30-60秒,得到样品待测液。

[0122] 表7

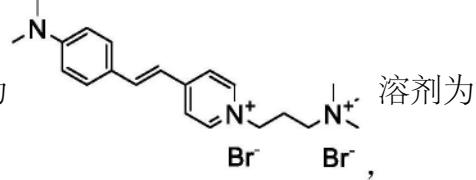
	对比例 3-1	对比例 3-2	对比例 3-3
[0123]	O50 1.5mM 脂肪醇聚氧乙烯醚-50	O50 5.5mM 脂肪醇聚氧乙烯醚-50	O50 1.71mM 脂肪醇聚氧乙烯醚-50
	N-月桂酰肌氨酸钠 8mM	N-月桂酰肌氨酸钠 4mM	N-月桂酰肌氨酸钠 9mM
	邻苯二甲酸钠 5mM	邻苯二甲酸钠 5mM	邻苯二甲酸钠 5mM
	水 1L	水 1L	水 1L
	非离子/两性离子表面活性剂 摩尔浓度比 0.19	非离子/两性离子表面活性剂 摩尔浓度比 1.38	非离子/两性离子表面活性剂 摩尔浓度比 0.19
	pH=5.5	pH=7.5	pH=7.5

[0124] 表8

	对比例 3-4	对比例 3-5
[0125]	O50 1.5mM 脂肪醇聚氧乙烯醚-50	O50 1.5mM 脂肪醇聚氧乙烯醚-50
	N-月桂酰肌氨酸钠 8mM	N-月桂酰肌氨酸钠 8mM
	邻苯二甲酸钠 12mM	柠檬酸钠 5mM
[0126]	水 1L	水 1L
	非离子/两性离子表面活性剂摩尔浓度比 0.19	非离子/两性离子表面活性剂摩尔浓度比 0.19
	pH=7.5	pH=7.5

[0127] 对比例4:

[0128] 准备商品化溶血剂(购自江苏荣盛嘉美生物试剂血细胞分析溶血剂RM-68LD溶血剂)。

[0129] 取1μl 10mM AIE白细胞分类染色液 (AIE分子为  溶剂为 $\text{Br}^- \text{ Br}^-$)，

无水DMSO) 加入1ml商品化溶血剂,充分混合,得到含有染色液的溶血剂混合物;取20μl新鲜EDTA-K2抗凝血液,加入1ml含有染色液的商品化溶血剂混合物,充分混合30-60秒,得到样品待测液。

[0130] 性能测试:

[0131] 将实施例和对比例的样品待测液通过荧光显微镜观察白细胞的形态特征,实施例1-1、实施例2-1、实施例3-1、对比例1-1、对比例4的样品待测液的白细胞荧光成像效果图如图1。同时通过检测白细胞的侧向散射光强度和荧光强度得到白细胞分类散点图,实施例的样品待测液的白细胞分类效果图如图2,对比例的样品待测液的白细胞分类效果图如图3和图4。根据散点图计算中性粒细胞和淋巴细胞及淋巴细胞和单核巴细胞颗粒群中心的分离

度,以此评价试剂对中性粒细胞和淋巴细胞及淋巴细胞和单核巴细胞的分离效果,结果如表9所示。

[0132] 表9实施例和对比例对中性粒细胞和淋巴细胞及淋巴细胞和单核巴细胞在SSC方向上的分离效果

	中性粒细胞和淋巴细胞颗粒群中心的分离度	淋巴细胞和单核巴细胞颗粒群中心的分离度
[0133]	实施例 1-1	65.521
	实施例 1-2	49.041
	实施例 1-3	34.713
	实施例 2-1	53.31
	实施例 2-2	39.661
	实施例 2-3	26.077
	实施例 3-1	42.953
	实施例 3-2	36.139
	实施例 3-3	34.785
	对比例 1-1	30.213

对比例 1-2	41.152	颗粒群重叠
对比例 1-3	46.39	颗粒群重叠
对比例 1-4	29.155	颗粒群重叠
对比例 2-1	25.179	0.559
对比例 2-2	36.125	颗粒群重叠
对比例 2-3	颗粒群重叠	颗粒群重叠
对比例 2-4	35.511	颗粒群重叠
对比例 2-5	44.011	颗粒群重叠
对比例 3-1	13.928	37.483
对比例 3-2	颗粒群重叠	颗粒群重叠
对比例 3-3	40.112	颗粒群重叠
对比例 3-4	38.328	颗粒群重叠
对比例 3-5	38.328	颗粒群重叠
对比例 4	颗粒群重叠	颗粒群重叠

[0135] 数据分析:

[0136] 图1结果表明本发明实施例1-1、实施例2-1、实施例3-1的溶血剂对红细胞裂解效率较高,对白细胞的形态破坏较小,对比例4的商品化溶血剂对白细胞的形态破坏较大;

[0137] 图2结果表明本发明实施例的溶血剂结合流式细胞仪和AIE白细胞分类染色液可以将白细胞分为淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞4个颗粒群;

[0138] 图3和图4结果表明,对比例的溶血剂结合AIE白细胞分类染色液在流式细胞仪上对白细胞的分类效果较差,无法显著区分各自细胞亚群;

[0139] 表9结果表明本发明实施例的溶血剂结合流式细胞仪和AIE白细胞分类染色液可以有效区分中性粒细胞颗粒散点群和淋巴细胞颗粒散点群及淋巴细胞颗粒散点群和单核巴细胞颗粒散点群,对比例溶血剂区分效果较差,不适用于AIE白细胞分类染色液。

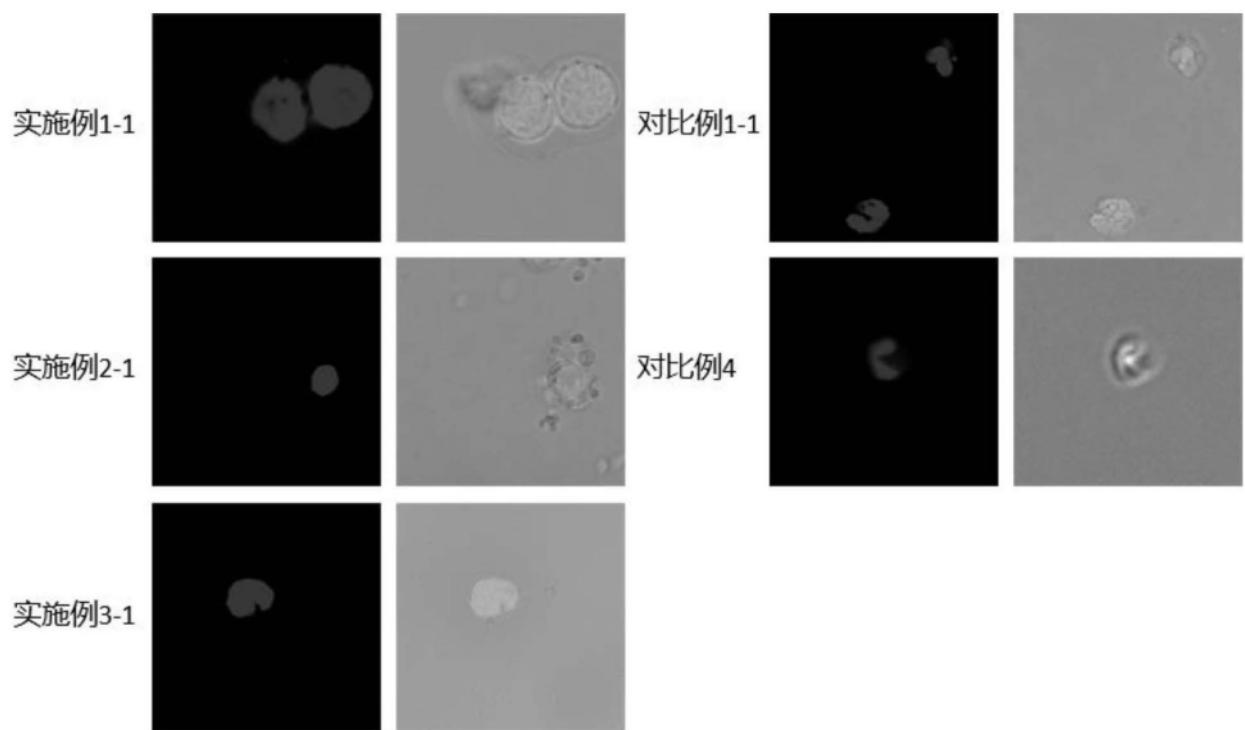


图1

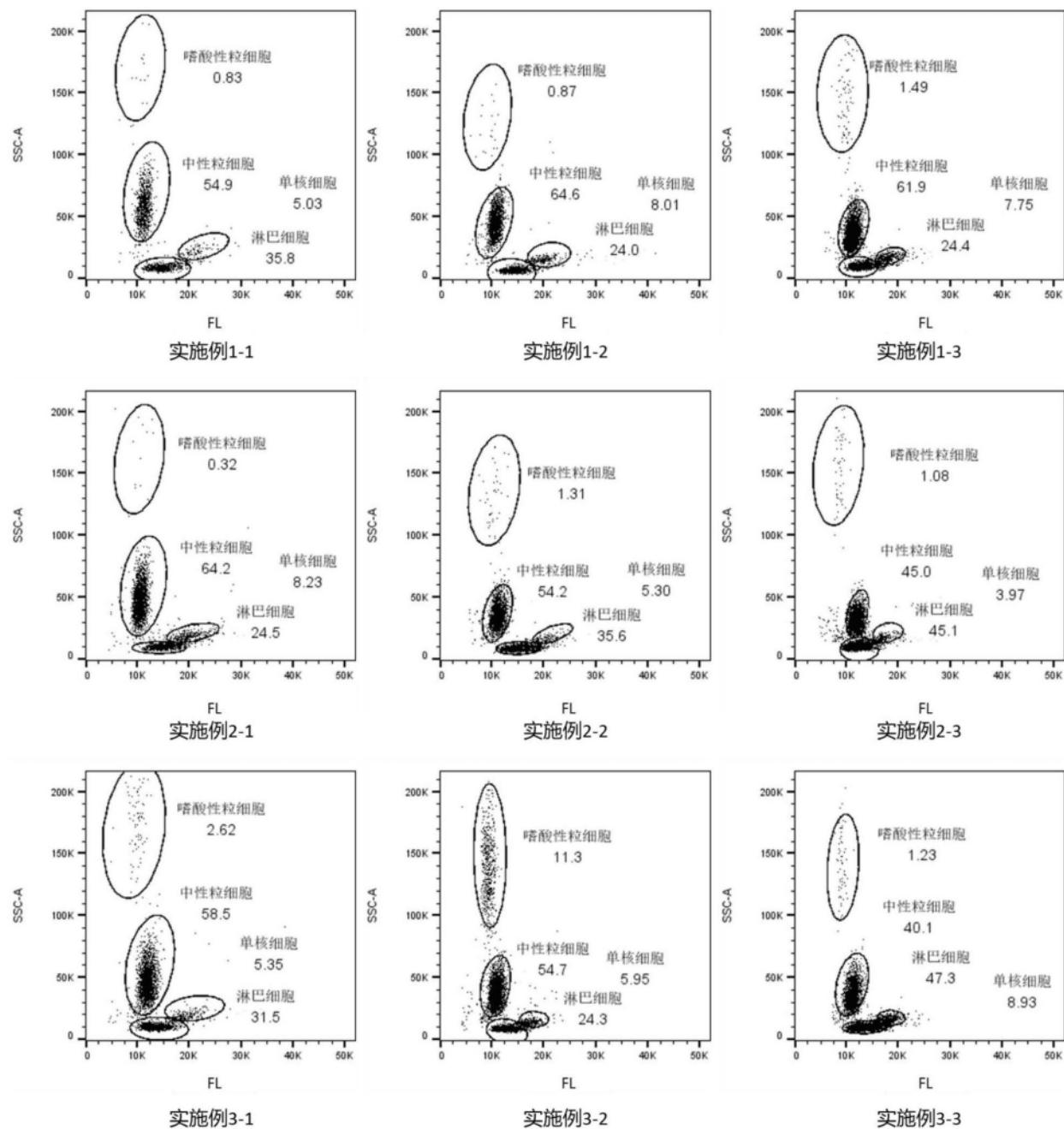


图2

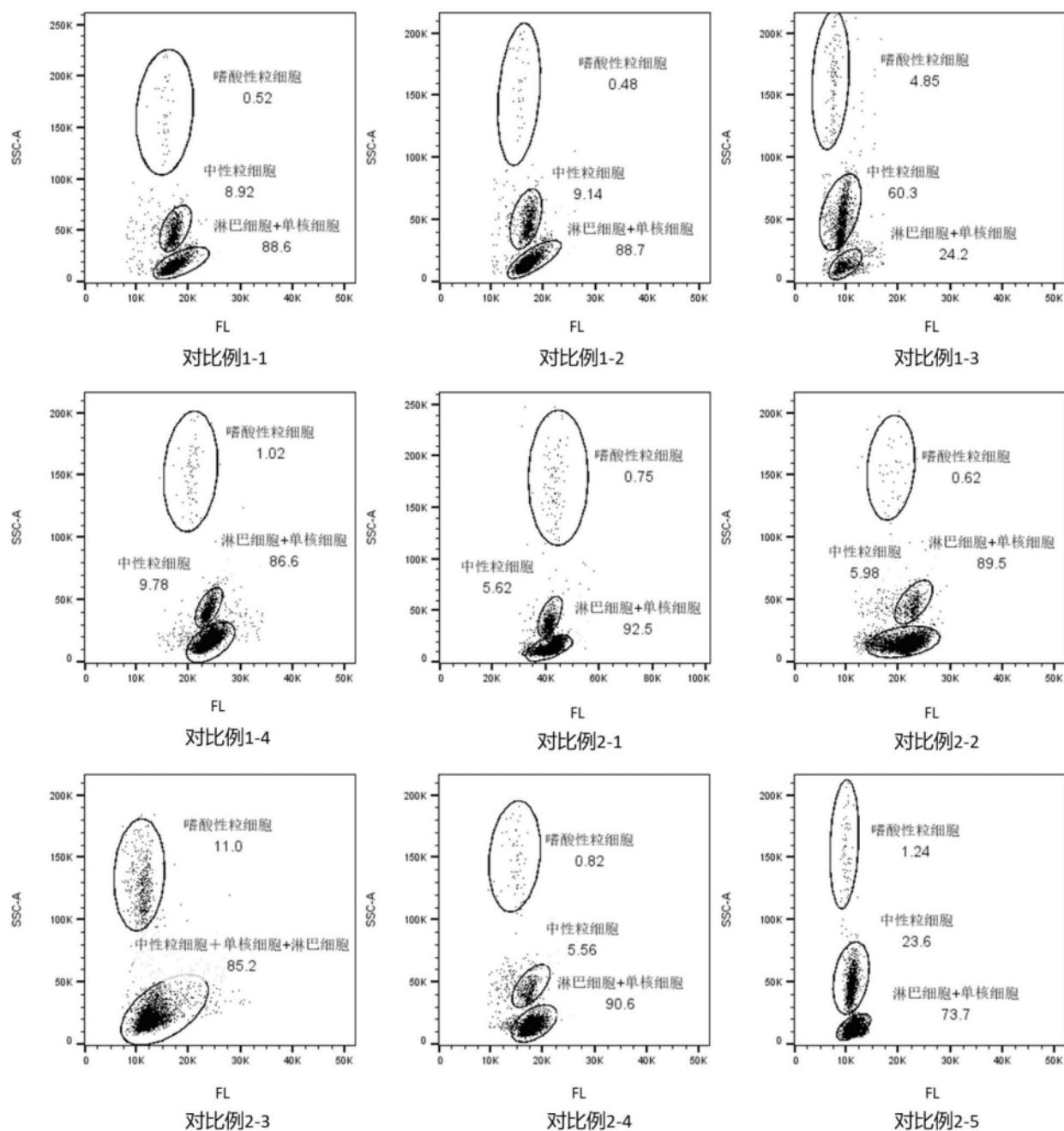


图3

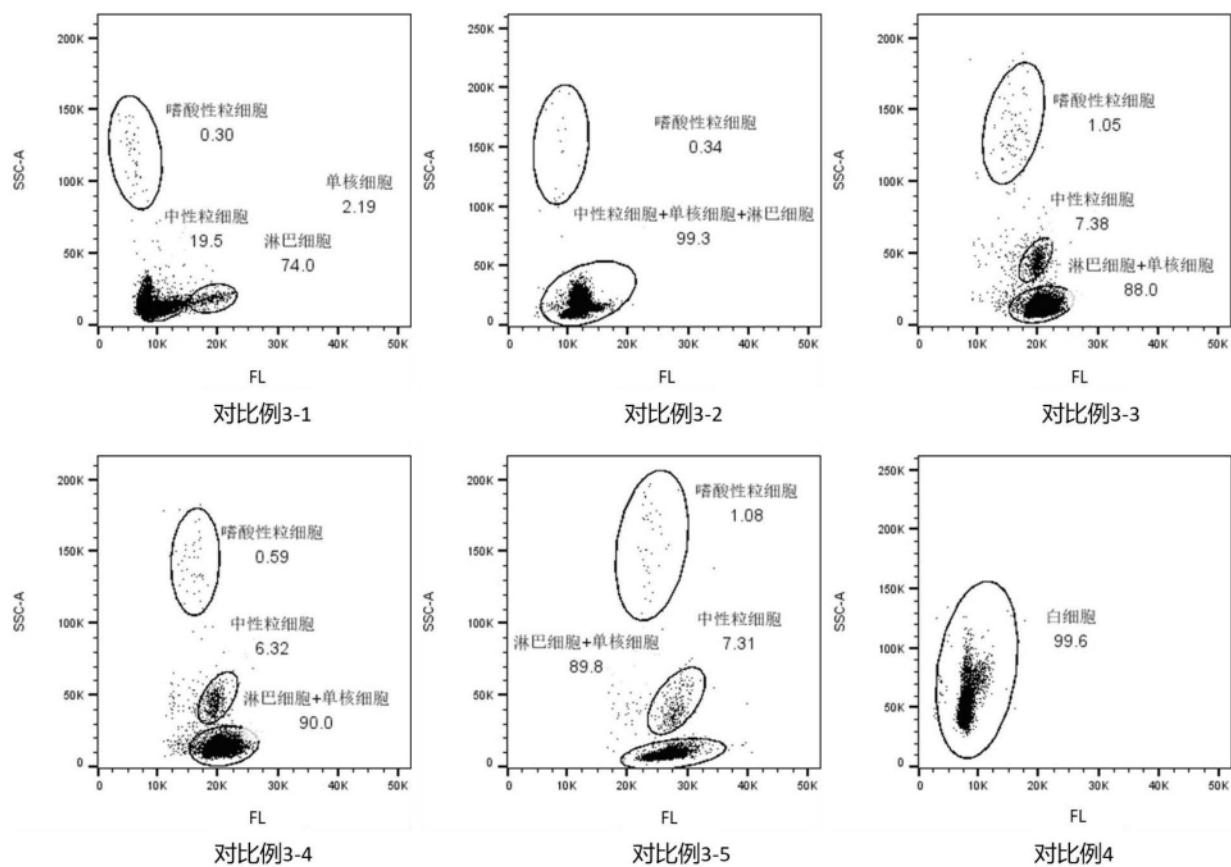


图4