



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117233067 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 15

(21) 申请号 202311494768.4

(22) 申请日 2023.11.10

(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

(51) Int. Cl.

G01N 15/14 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

C12Q 1/6881 (2018.01)

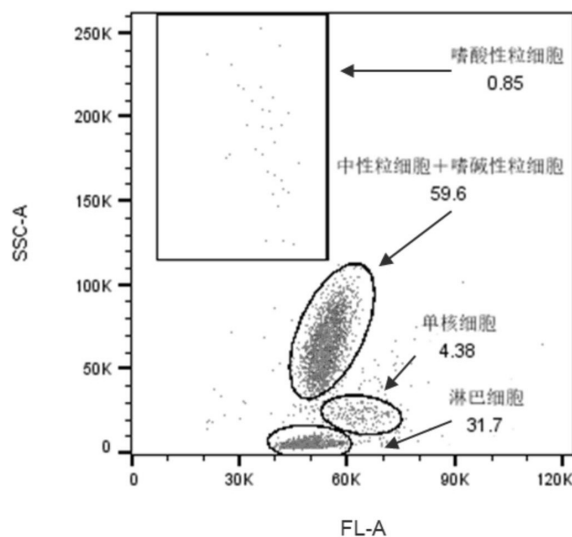
权利要求书4页 说明书12页 附图8页

(54) 发明名称

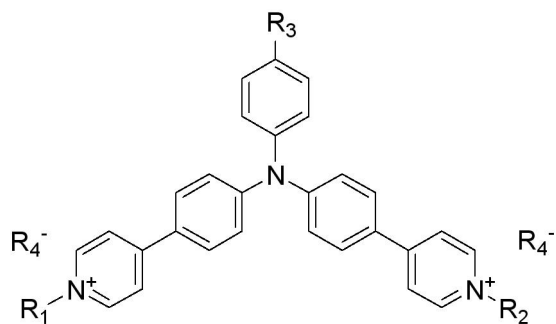
一种白细胞检测试剂盒及其应用

(57) 摘要

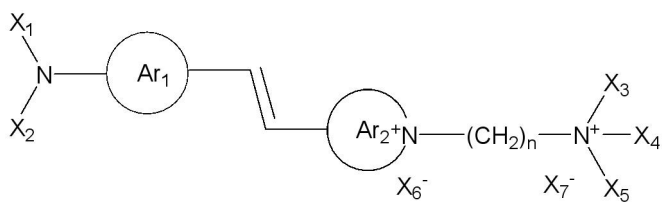
本发明公开了一种白细胞检测试剂盒及其应用;所述白细胞检测试剂盒包括式(1)到式(4)中任意一种结构的AIE荧光染料。本发明将血液样品和红细胞溶解剂混合后,加入AIE荧光染料溶液;检测所得混合物的散射光特性和荧光特性;根据散射光特性和荧光特性对白细胞进行分类和计数。本发明利用具有聚集诱导发光特性的AIE荧光染料作为白细胞分类试剂,AIE荧光染料特异性结合白细胞的核酸后,通过流式细胞仪检测,可以对白细胞进行准确的分类统计;而且AIE荧光染料检测灵敏性高,光稳定性好,可降低单次使用剂量,不易发生荧光猝灭现象。



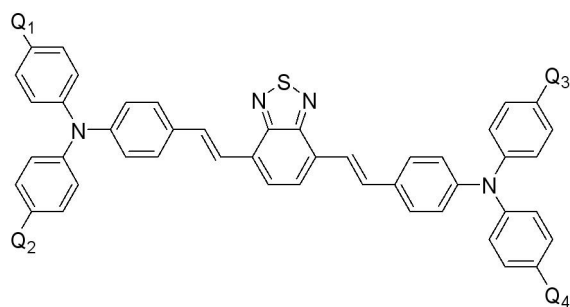
1. 一种白细胞检测试剂盒, 其特征在于, 包括式 (1) 到式 (4) 中任意一种结构的 AIE 荧光染料;



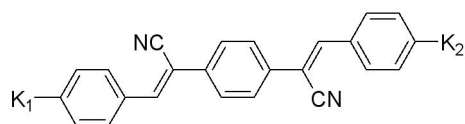
(1)



(2)

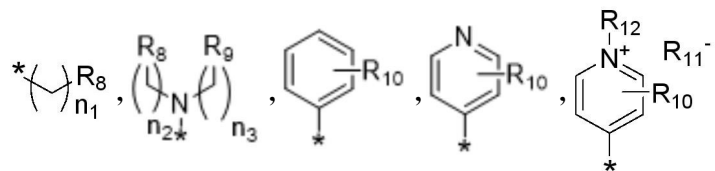


(3)

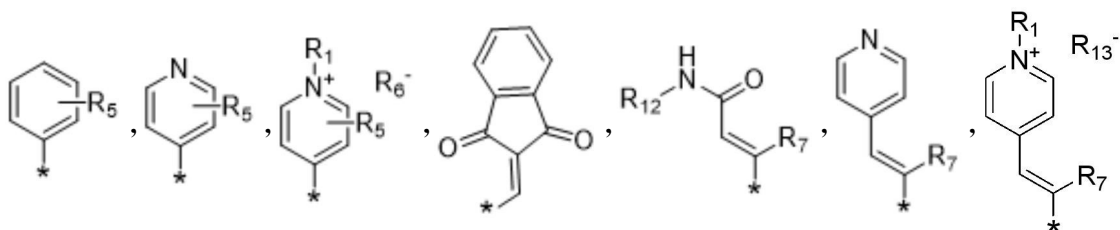


(4)

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 $-H, -CH_3, -COOH, -OH, -NH_2, -CHO, -CN$ 中的一种;

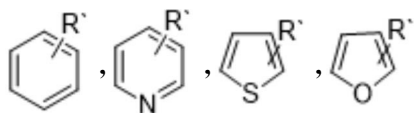
n_1, n_2, n_3 为大于等于1的整数;

R_5 为 H 或者选自 R_1 结构中的一种;

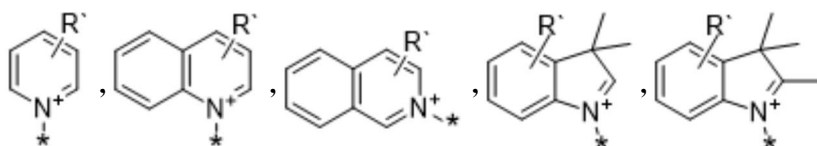
R_7 为 $-H, -CN, -CH_3$ 中的一种;

$R_4^-, R_6^-, R_{11}^-, R_{13}^-$ 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;

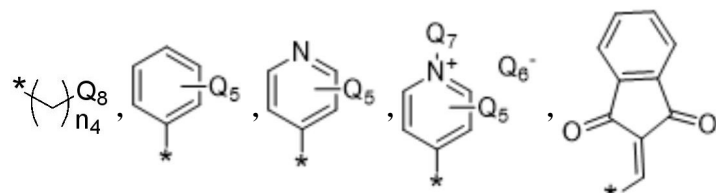
X_1, X_2 为相同或者不同的, 取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链、支链或者环状烷基链;

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:

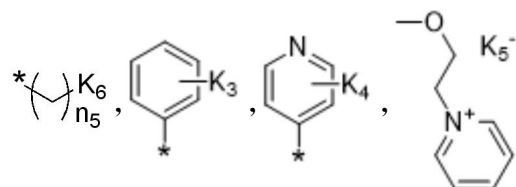


Q_5, Q_7, Q_8 各自独立选自 $-H, -CH_3, -COOH, -OH, -NH_2, -CHO, -CN$ 中的一种;

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 $-H, -CH_3, -COOH, -OH, -NH_2, -CHO, -CN$ 中的一种;

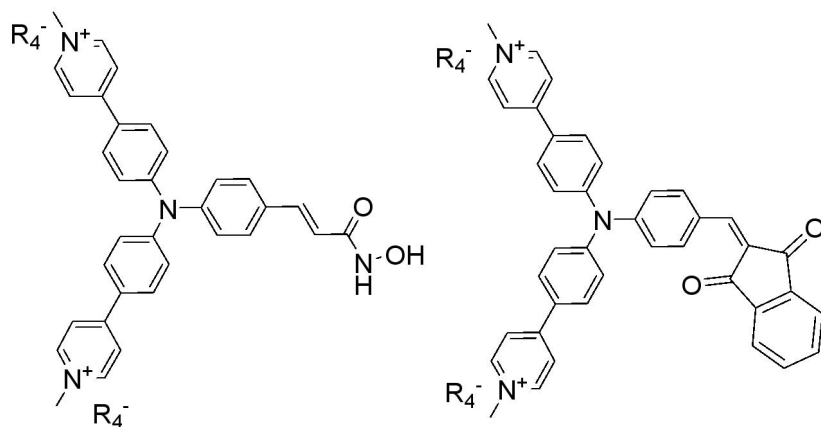
K_5^- 为一价阴离子;

n_5 为大于等于1的整数;

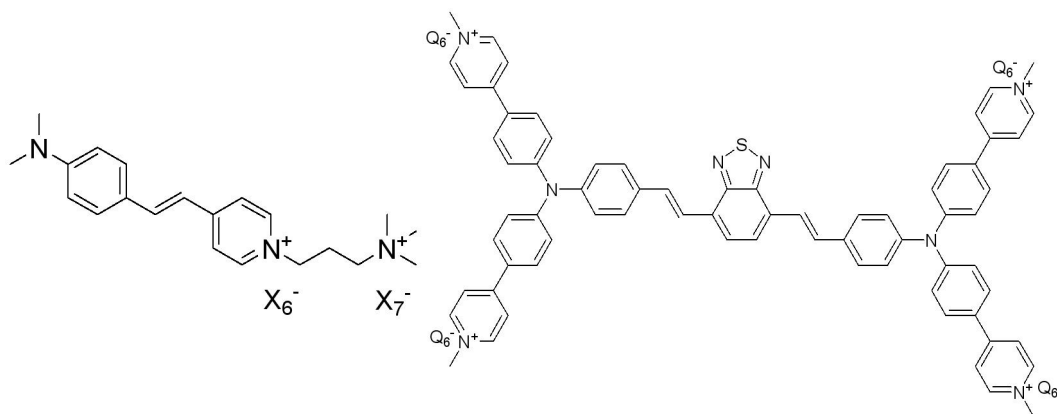
其中, * 表示取代位置。

2. 根据权利要求1所述的白细胞检测试剂盒,其特征在于,所述一价阴离子选自 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 SbF_6^- 、 $CF_3SO_3^-$ 、 ClO_4^- 中的一种。

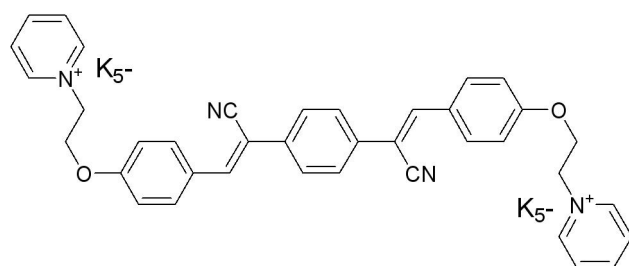
3. 根据权利要求1所述的白细胞检测试剂盒,其特征在于,所述AIE荧光染料结构式为化学式I-化学式V中的一种;



化学式 I 化学式 II



化学式 III 化学式 IV



化学式 V

R_4^- , X_6^- , X_7^- , Q_6^- , K_5^- 为一价阴离子。

4. 根据权利要求1所述的白细胞检测试剂盒,其特征在于,所述白细胞检测试剂盒配合激光器光源使用。

5. 根据权利要求4所述的白细胞检测试剂盒,其特征在于,所述激光器光源为流式细胞仪或商用血球仪的半导体激光器产生。

6. 权利要求1-5任一项所述的白细胞检测试剂盒在白细胞检测中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将血液样品和红细胞溶解剂混合;

- (2) 将AIE荧光染料溶液加入步骤(1)的混合物中;
- (3) 检测步骤(2)所得混合物的散射光特性和荧光特性;
- (4) 根据散射光特性和荧光特性对白细胞进行分类和计数。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征不在于,步骤(1)加入红细胞溶解剂后孵育5-10分钟,离心弃掉上清液,加PBS缓冲液重悬。

9. 根据权利要求7所述的应用,其特征不在于,步骤(2)AIE荧光染料溶液加入后孵育0.5-3分钟。

10. 根据权利要求7所述的应用,其特征不在于,步骤(3)的检测步骤(2)所得混合物的荧光特性和散射光特性具体为:在流式细胞仪或商用血球仪中,测定混合物的侧向散射光强度和荧光强度。

一种白细胞检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于白细胞检测技术领域,具体涉及一种白细胞检测试剂盒及其应用。

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。医疗检测中常用图像分析法和血球仪对白细胞进行分类分析,其结果可反映血液内白细胞是否存在异常分布,为医护人员做诊断提供了重要的依据。图像分析法着重强调了形态学检验的重要性,但是其反应的检测项目较少,且手工操作易受检验人员技术的限制,工序繁琐耗时长。现在普遍采用血球仪对血液进行检测。血球仪的原理主要分为:体积、电导和激光散射原理;电阻抗、射频和细胞化学技术;双鞘流技术和细胞化学染色法;多角度偏振光激光散射和细胞化学染色技术。细胞化学染色技术主要指核酸荧光染色技术。

[0003] 中国专利CN 113336723公开了一类花菁荧光探针用于全自动血细胞分析仪的DIFF通道中,是将苯酚结构引入甲川链上形成one Doner-two Acceptor结构,可用红光激发。但是花菁类染料的荧光量子产率普遍比其他染料低,菁类染料容易发生聚集形成聚集体,聚集体会导致荧光猝灭的现象(ACQ),荧光不稳定。

[0004] 中国专利CN 103424540公开了一种白细胞分类试剂,利用多肽物质作为量子点的稳定剂,与近红外区Cy5菁染料共价连接分子构成的量子点作为染色剂,多肽类主要是谷胱甘肽或还原型谷胱甘肽。虽然荧光量子点色彩丰富、发光强度高且光化学稳定性好,但是其在环境中不稳定,易于聚集且对生物体有毒副作用;其合成条件十分苛刻,成本高昂,不利于降低检测成本。

[0005] 美国专利 3883247公开了一种白细胞分类试剂,是利用吖啶橙和核酸形成复合物使荧光增强,通过不同白细胞的红色和绿色的荧光强度差异对白细胞进行分类。但是吖啶橙染料分子在彼此之间传递能量的时候,易导致光猝灭,令核酸染料复合物没有荧光发出,影响了检测的准确性。吖啶橙染料还易和塑料管路发生作用,令背景荧光增强。

[0006] 唐本忠教授首次提出了“聚集诱导发光(AIE)”的科学概念,提出了分子内运动受限(RIM)的AIE工作机制,解决了传统发光染料ACQ的难题。AIE荧光染料因其有较大的斯托克斯位移和抗荧光漂白等性质,已经广泛应用于有机发光二极管、生物成像、刺激响应、传感器和光波导等领域。用于生物成像领域的AIE荧光染料有生物学研究、医学研究、临床检验等方向的应用前景。但目前没有将其用于白细胞检测的报道。

发明内容

[0007] 针对现有技术存在的不足,本发明提出了一种白细胞检测试剂盒及其应用;本发明首次提出将具有聚集诱导发光特性的AIE荧光染料作为染色剂,在红细胞溶解剂作用下

将红细胞溶解,然后对白细胞内核酸物质进行染色;并结合流式细胞分析技术检测白细胞的前向散射光或侧向散射光,两种散射光反映了白细胞大小和内部结构信息,本发明优选侧向散射光,并结合流式细胞仪可检测到的荧光信号,对中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞进行分类和/或计数。

[0008] 本发明的具有聚集诱导发光特性的AIE荧光染料能够特异性结合细胞内核酸,将其应用在白细胞分类检测中,可应用在半导体激光器为光源的血液分析设备或流式细胞仪上。可配合血液稀释剂和溶血剂共同使用,在流式细胞仪和商用血球仪上对血液中的白细胞进行分类分析。

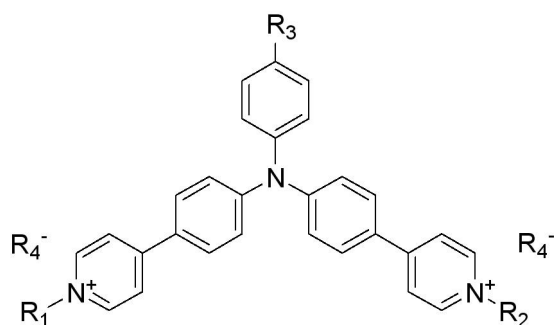
[0009] 本发明提供的白细胞检测试剂盒,可以区分和计数血液中的白细胞,包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞。

[0010] 本发明提供分类和/或计数血液中白细胞的方法。包括血液样本先进行预处理(和红细胞溶解剂混合),然后再与本发明的试剂混合,随后测定样品中的散射光特性和荧光特性,根据散射光特性和荧光特性将样品内白细胞分类和/或计数。

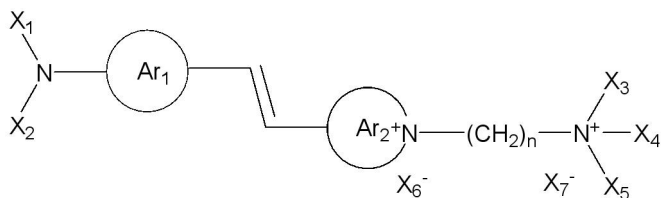
[0011] 本发明提出用于白细胞分类的染料是生物成像类AIE荧光染料中水溶性较好,且在水溶液里不发光的染料,相比于其他传统染料,背景荧光较低;此染料不易和塑料及玻璃发生作用,易清洗,解决了吖啶橙等传统染料对血细胞分析仪内部管路的影响问题;此染料对DNA的响应灵敏度较高,可实现白细胞细胞核特异性标记,光稳定性较好,克服了现有技术因缺乏光稳定性而造成结果偏差的问题。

[0012] 本发明的技术方案如下:

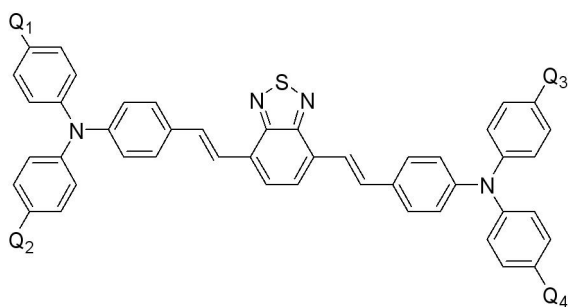
一种白细胞检测试剂盒,包括式(1)到式(4)中任意一种结构的AIE荧光染料;



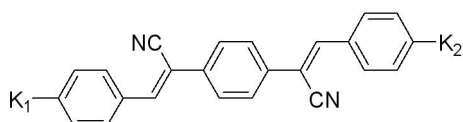
[0013] (1)



[0014] (2)

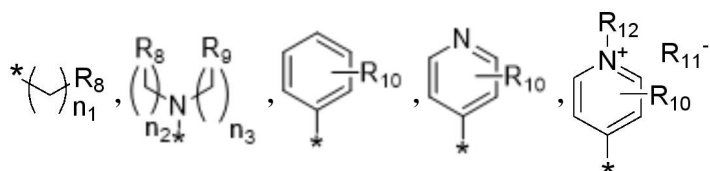
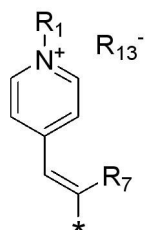
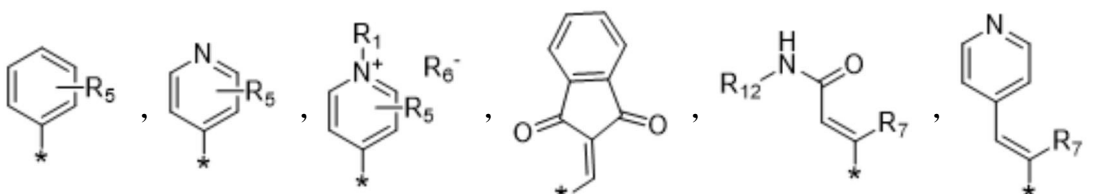


[0015] (3)



[0016] (4)

式(1)中, R_1, R_2 各自独立选自以下结构中的一种:

[0017] R_3 选自以下结构:[0018] 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;

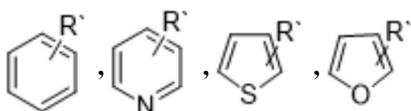
n_1, n_2, n_3 为大于等于1的整数;

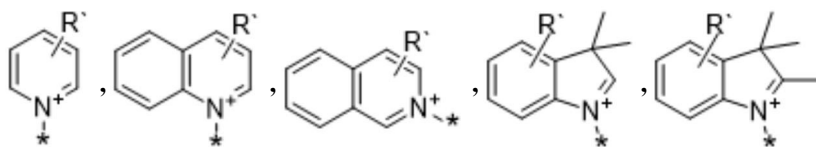
R_5 为H或者选自 R_1 结构中的一种;

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:

[0019] Ar_2 选自以下结构中的一种:



[0020] 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;

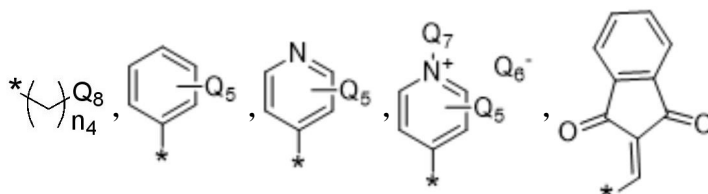
X_1 、 X_2 为相同或者不同的,取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链、支链或者环状烷基链;

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:

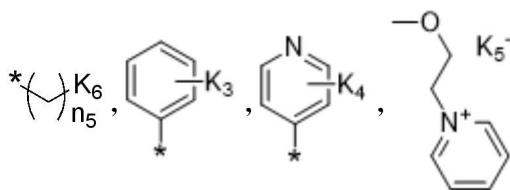


[0021] Q_5 、 Q_7 、 Q_8 各自独立选自-H, - CH_3 , - $COOH$, -OH, - NH_2 , -CHO, -CN中的一种;

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:



[0022] K_3 、 K_4 、 K_6 各自独立选自-H, - CH_3 , - $COOH$, -OH, - NH_2 , -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;

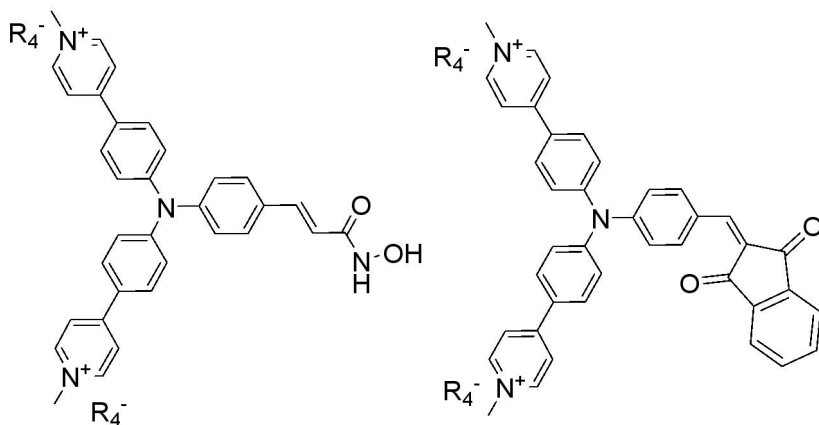
其中,*表示取代位置。

[0023] 优选的,所述一价阴离子选自 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 SbF_6^- 、 $CF_3SO_3^-$ 、 $C10_4^-$ 中的一种。

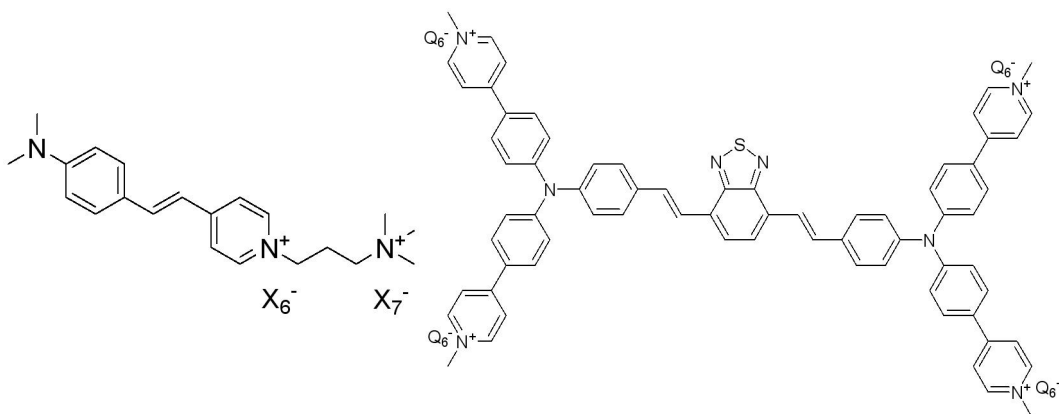
[0024] 优选的, n 、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 为1-20的整数(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20);

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。

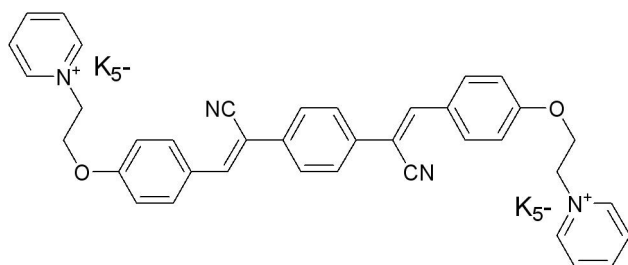
[0025] 优选的,所述AIE分子的结构式为化学式I-化学式V中的一种;



[0026] 化学式 I 化学式 II



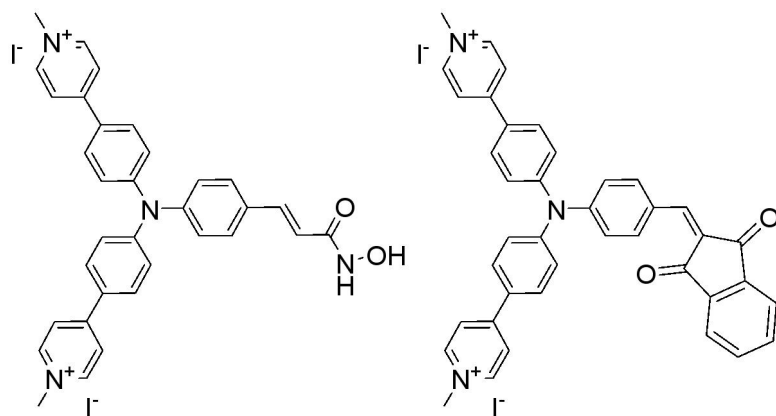
[0027] 化学式 III 化学式 IV



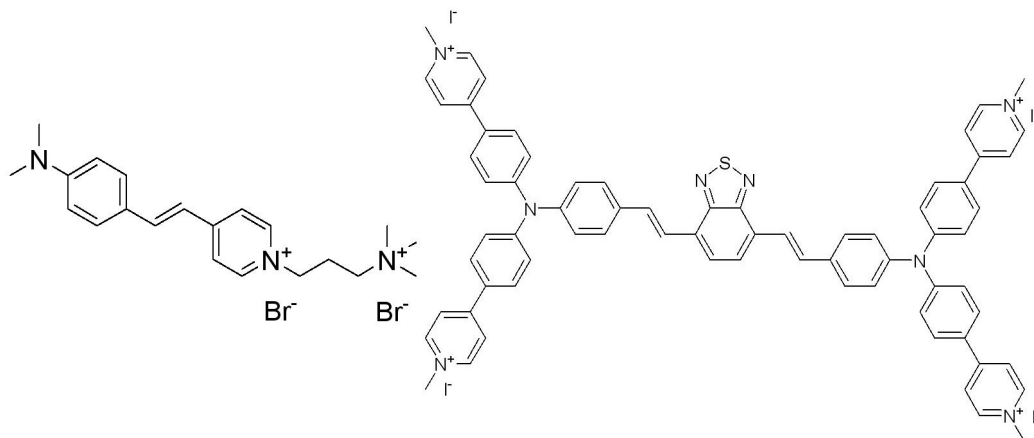
[0028] 化学式 V

R_4^- , X_6^- , X_7^- , Q_6^- , K_5^- 为一价阴离子。

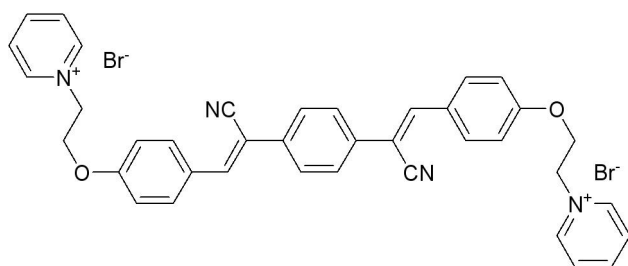
[0029] 进一步优选的,所述AIE分子的结构式为如下化学式I-化学式V中的一种;



[0030] 化学式 I 化学式 II



[0031] 化学式 III 化学式 IV



[0032] 化学式 V 。

[0033] 优选的,所述白细胞检测试剂盒配合激光器光源使用。

[0034] 进一步优选的,所述激光器光源为流式细胞仪或商用血球仪的半导体激光器产生。

[0035] 上述的白细胞检测试剂盒在(非疾病诊断和治疗)白细胞检测中的应用。

[0036] 优选的,包括以下步骤:

- (1) 将血液样品和红细胞溶解剂混合;
- (2) 将AIE荧光染料溶液加入步骤(1)的混合物中;
- (3) 检测步骤(2)所得混合物的散射光特性和荧光特性;
- (4) 根据散射光特性和荧光特性对白细胞进行分类和计数。

[0037] 进一步优选的,步骤(1)加入红细胞溶解剂后孵育5-10分钟,离心弃掉上清液,加PBS缓冲液重悬。

[0038] 进一步优选的,步骤(2)AIE荧光染料溶液加入后孵育0.5-3分钟。

[0039] 进一步优选的,步骤(3)的检测步骤(2)所得混合物的荧光特性和散射光特性具体为:在流式细胞仪或商用血球仪中,测定混合物的侧向散射光强度和荧光强度。

[0040] 本发明式(1)到式(4)的AIE荧光染料可与细胞中核酸结合发出荧光,激光照射后产生荧光信号,其荧光信号反应了细胞内的核酸物质含量。

[0041] 本发明中使用的血液样本是外周血全血,可以是静脉血也可以是末梢血。

[0042] 本发明中的散射光信号是指可由市售血液分析仪或流式细胞仪检测的散射光。这种散射光包括但不限于正向低角度散射光(接受光角度为约0-5度)和侧向高角度散射光(接受光角度为约70-90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。

[0043] 本发明相对于现有技术,具有如下的优点及有益效果:

(1) 本发明利用具有聚集诱导发光特性的AIE荧光染料作为白细胞分类试剂,AIE荧光染料特异性结合白细胞的核酸后,通过流式细胞仪检测,可以对白细胞进行准确的分类统计;而且AIE荧光染料检测灵敏性高,光稳定性好,可降低单次使用剂量,不易发生荧光猝灭现象;

(2) 本发明的AIE荧光染料水溶性较好,不易和塑料及玻璃发生作用,对血细胞分析仪内部管路的影响较小,易清洗,不影响后续检测结果的准确性;

(3) 本发明的AIE荧光染料在水溶液中几乎无光,极大降低背景荧光的干扰;

(4) 本发明的AIE荧光染料对核酸响应有较高的灵敏性,1 $\mu\text{g/mL}$ 的脱氧核糖核酸即可有较大的荧光强度变化,且脱氧核糖核酸含量增加可显著提高荧光强度;

(5) 本发明的AIE荧光染料斯托克斯位移大,相同激发波长其发射波长可以和商业的DIFF通道染料区分开。

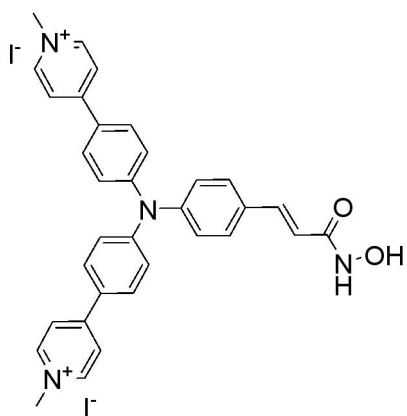
附图说明

[0044] 图1是式I荧光染料脱氧核糖核酸响应图;
图2是式II荧光染料脱氧核糖核酸响应图;
图3是式III荧光染料脱氧核糖核酸响应图;
图4是式IV荧光染料脱氧核糖核酸响应图;
图5是式V荧光染料脱氧核糖核酸响应图;
图6是式VI荧光染料脱氧核糖核酸响应图;
图7是式VII荧光染料脱氧核糖核酸响应图;
图8是荧光染料白细胞核定位图;
图9是荧光染料血涂片染色图;
图10是式I荧光染料流式测试图;
图11是式II荧光染料流式测试图;
图12是式III荧光染料流式测试图;
图13是式IV荧光染料流式测试图;
图14是式V荧光染料流式测试图;
图15是式VI荧光染料流式测试图。

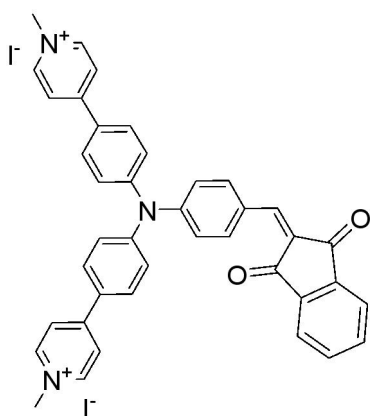
具体实施方式

[0045] 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。

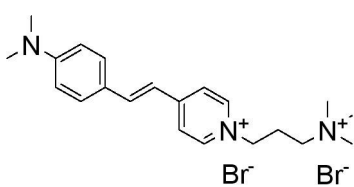
[0046] 实施例所用的荧光染料化学式I、化学式II、化学式III、化学式IV、化学式V、化学式VI、化学式VII的结构如下:



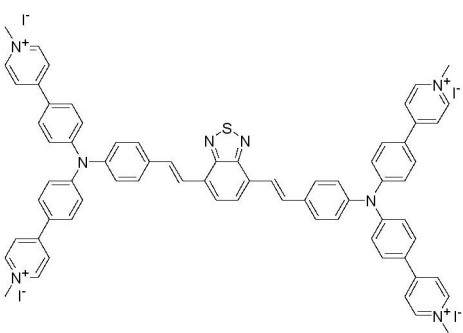
[0047] 化学式 I



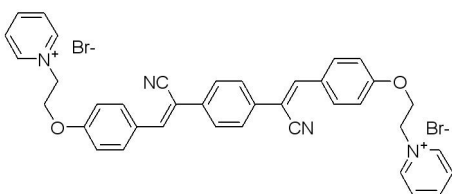
[0048] 化学式 II



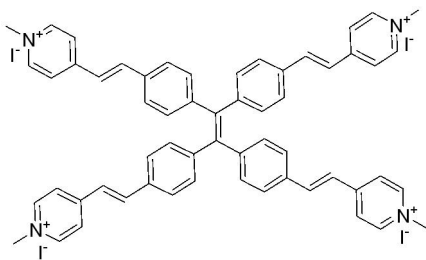
[0049] 化学式 III



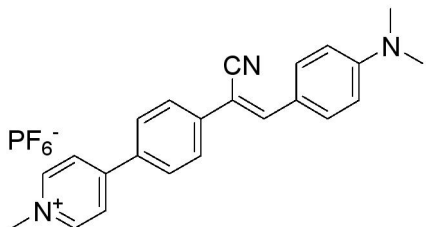
[0050] 化学式 IV



[0051] 化学式 V



[0052] 化学式 VI



[0053] 化学式 VII

实施例1: 荧光染料核酸响应实验

(1) 称取2 mg式I染料固体, 加入257.5 μL 生物级无水DMSO, 充分溶解得到10 mM荧光染料母液。用纯水将母液稀释至体积为2 mL 浓度为5 μM 的工作溶液。以此为准, 分别向荧光染料的工作溶液中滴加脱氧核糖核酸溶液至0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、0.9 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$, 分别测出其荧光发射光谱; 荧光染料的浓度为5 μM , 逐渐加入脱氧核糖核酸至其浓度为0-1 $\mu\text{g/mL}$, 测试结果显示在图1中。

[0054] (2) 称取2 mg式II染料固体, 加入238 μL 生物级无水DMSO, 充分溶解得到10 mM荧光染料母液。用纯水将母液稀释至体积为2 mL 浓度为1 μM 的工作溶液。以此为准, 分别向荧光染料的工作溶液中滴加脱氧核糖核酸溶液至0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、0.9 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$, 分别测出其荧光发射光谱。荧光染料的浓度为1 μM , 逐渐加入脱氧核糖核酸至其浓度为0-1 $\mu\text{g/mL}$, 测试结果显示在图2中。

[0055] (3) 称取2 mg式III染料固体, 加入412 μL 生物级无水DMSO, 充分溶解得到10 mM荧光染料母液。用纯水将母液稀释至体积为2 mL 浓度为5 μM 的工作溶液。以此为准, 分别向荧光染料的工作溶液中滴加脱氧核糖核酸溶液至1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 、7 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、9 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$, 分别测出其荧光发射光谱。荧光染料的浓度为5 μM , 逐渐加入脱氧核糖核酸至其浓度为0-10 $\mu\text{g/mL}$, 测试结果显示在图3中。

[0056] (4) 称取2 mg式VI染料固体, 加入129 μL 生物级无水DMSO, 充分溶解得到10 mM荧光染料母液。用纯水将母液稀释至体积为2 mL 浓度为5 μM 的工作溶液。以此为准, 分别向荧光染料的工作溶液中滴加脱氧核糖核酸溶液至0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、0.9 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$, 分别测出其荧光发射光谱; 荧光染料的浓度为5 μM , 逐渐加入脱氧核糖核酸至其浓度为0-1 $\mu\text{g/mL}$, 测试结果显示在图4 中。

[0057] (5) 称取2 mg式V染料固体, 加入271 μL 生物级无水DMSO, 充分溶解得到10 mM荧光染料母液。用纯水将母液稀释至体积为2 mL 浓度为5 μM 的工作溶液。以此为准, 分别向

荧光染料的工作溶液中滴加脱氧核糖核酸溶液至0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、0.9 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ ，分别测出其荧光发射光谱；荧光染料的浓度为5 μM ，逐渐加入脱氧核糖核酸至其浓度为0-1 $\mu\text{g/mL}$ ，测试结果显示在图5中。

(6) 称取2 mg式IV染料固体，加入152 μL 生物级无水DMSO，充分溶解得到10 mM荧光染料母液。用纯水将母液稀释至体积为2 mL 浓度为0.1 μM 的工作溶液。以此为准，分别向荧光染料的工作溶液中滴加脱氧核糖核酸溶液至0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、0.9 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ ，分别测出其荧光发射光谱；荧光染料的浓度为0.1 μM ，逐渐加入脱氧核糖核酸至其浓度为0-1 $\mu\text{g/mL}$ ，测试结果显示在图6中。

[0058] (7) 称取2 mg式VII染料固体，加入587 μL 生物级无水DMSO，充分溶解得到10 mM荧光染料母液。用纯水将母液稀释至体积为2 mL 浓度为5 μM 的工作溶液。以此为准，分别向荧光染料的工作溶液中滴加脱氧核糖核酸溶液至1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 、7 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、9 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ ，分别测出其荧光发射光谱；荧光染料的浓度为5 μM ，逐渐加入脱氧核糖核酸至其浓度为0-10 $\mu\text{g/mL}$ ，测试结果显示在图7 中。

[0059] 实施例2: 荧光染料白细胞核定位实验

用白细胞提取试剂盒提取外周血内的白细胞，用冷甲醛固定后，加10-20 μL 5 μM 浓度的式I-VI荧光染料室温下孵育5-10 min，然后用PBS洗3次，每次轻轻摇晃30s。使用徕卡激光共聚焦显微镜成像，荧光染料的激发波长为488 nm，接受波段为500-650 nm，重复实验3次，测试结果显示在图8中。

[0060] 实施例3: 荧光染料血涂片染色实验

将新鲜的完全抗凝的外周血滴在载玻片上，制备成涂片，用冷甲醇固定后滴加10-20 μL 5 μM 的式I-VI荧光染料工作液覆盖涂片，室温静置10 min后用激光共聚焦显微镜对血涂片进行成像，实验结果显示在图9中。

[0061] 实施例4: 荧光染料对血液样品中白细胞的测定实验

取五份100 μL 新鲜的不同人体来源的完全抗凝的外周血加入1 mL红细胞裂解液，室温下孵育5-10分钟，400g 离心5分钟，弃掉上清液体，加300 μL PBS缓冲液(pH=7.4)重悬细胞沉淀，分别加入终浓度为5 μM 式I-VI荧光染料混匀孵育1分钟，形成测定用试样。采用BD FACSCelesta流式细胞仪，激发波长为488 nm，测定测试样本的侧向散射光特性和荧光特性，得到白细胞散点图。

[0062] 对血液样本的测试结果如图10-15所示，表明本发明式I-V荧光染料可以实现白细胞4个亚群的分类识别，分别为淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞加嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞，表明本发明白细胞分类染色液能够实现白细胞各亚群的有效分类。

[0063] 对图10-14中白细胞各亚群进行计数，结果如表1-5(以希森美康XN-20对新鲜的完全抗凝的外周血进行白细胞计数作为对比)。

[0064] 表1

	式I流式细胞仪 (%)	希森美康XN-20 (%)
中性粒细胞+嗜碱性粒细胞	59.6	60.00
单核细胞	4.38	4.10
淋巴细胞	31.7	34.80
嗜酸性粒细胞	0.85	1.10

[0065] 表2

	式II流式细胞仪 (%)	希森美康XN-20 (%)
中性粒细胞+嗜碱性粒细胞	48.7	50.50
单核细胞	5.24	5.90
淋巴细胞	37.7	40.00
嗜酸性粒细胞	3.12	3.60

[0066] 表3

	式III流式细胞仪 (%)	希森美康XN-20 (%)
中性粒细胞+嗜碱性粒细胞	54	57.80
单核细胞	6.75	6.40
淋巴细胞	32.9	33.30
嗜酸性粒细胞	2.16	2.50

[0067] 表4

	式IV流式细胞仪 (%)	希森美康XN-20 (%)
中性粒细胞+嗜碱性粒细胞	44	45.30
单核细胞	4.29	6.00
淋巴细胞	45.1	45.30
嗜酸性粒细胞	2.5	3.40

[0068] 表5

	式V流式细胞仪 (%)	希森美康XN-20 (%)
中性粒细胞+嗜碱性粒细胞	55.9	58.50
单核细胞	6.22	6.30
淋巴细胞	31	32.30
嗜酸性粒细胞	2.8	2.90

[0069] 结果分析:

图1-6结果表明式I-VI荧光染料对脱氧核糖核酸具有较好的响应,图7结果表明式VII AIE荧光染料对脱氧核糖核酸无响应,说明式I-VI提出的AIE荧光染料具有DNA响应性质,有在白细胞分类计数应用的潜质。

[0070] 图8结果表明式I-VI荧光染料特异性标记白细胞的细胞核,说明荧光染料可以靶向定位白细胞的细胞核。

[0071] 图9血涂片的结果表明白细胞的细胞核有荧光,红细胞没有荧光,说明式I-VI荧光染料可以特异性标记白细胞,不能标记红细胞。

[0072] 从图10-14中可以看出式I-V荧光染料可以通过带有侧向荧光、正向低角度散射光(接受光角度为约0-5度)和侧向高角度散射光(接受光角度为约70-90度)的流式细胞仪将外周血内的白细胞分为四群,分别是淋巴细胞群、单核细胞群、中性粒细胞加嗜碱性粒细胞群、嗜酸性粒细胞群;图15结果表明式VI荧光染料不可以通过带有侧向荧光、正向低角度散射光(接受光角度为约0-5度)和侧向高角度散射光(接受光角度为约70-90度)的流式细胞仪将外周血内的白细胞分为四群;图10-15的结果表明了可以特异性标记白细胞细胞核

的分子里只有式I-V能够在流式细胞仪(有侧向荧光、正向散射光(接受光角度为约0-5度)和侧向散射光(接受光角度为约70-90度))上对白细胞进行分类。

[0073] 从表1-5可以看出,式I-V荧光染料可以对外周血内的白细胞进行分群计数,分别得到淋巴细胞群、单核细胞群、中性粒细胞加嗜碱性粒细胞群、嗜酸性粒细胞群占总白细胞数量的百分比,且结果和希森美康XN-20测试得到的统计结果相近。

[0074] 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。

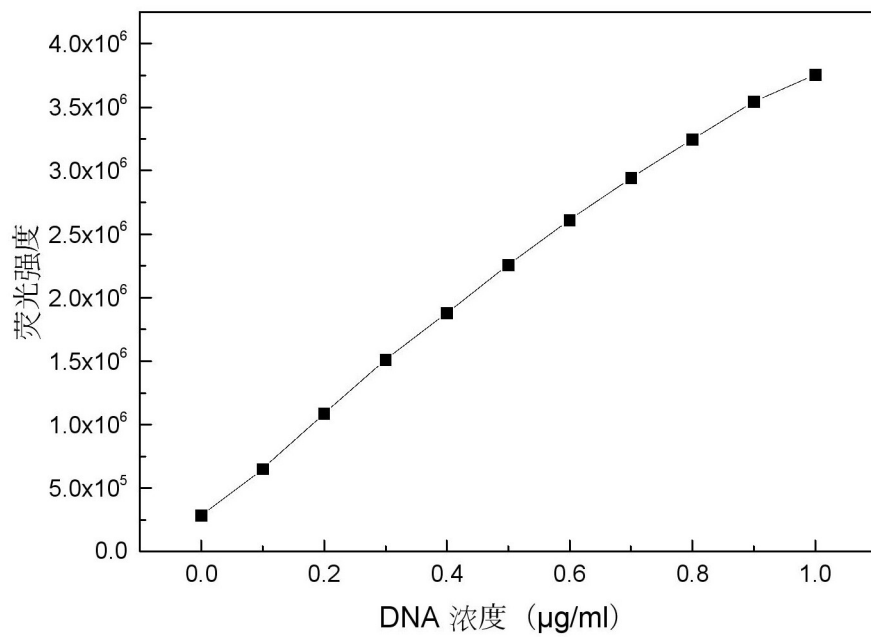


图1

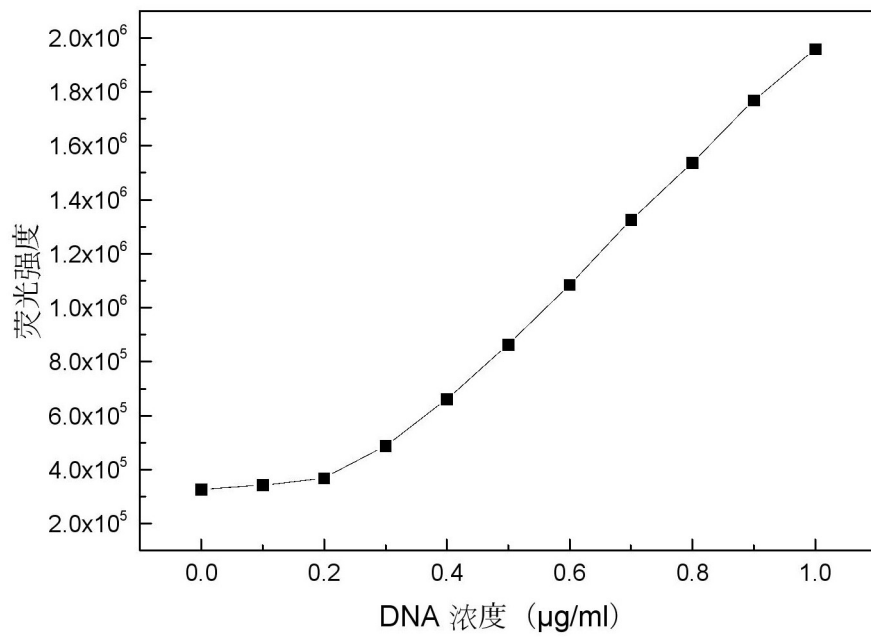


图2

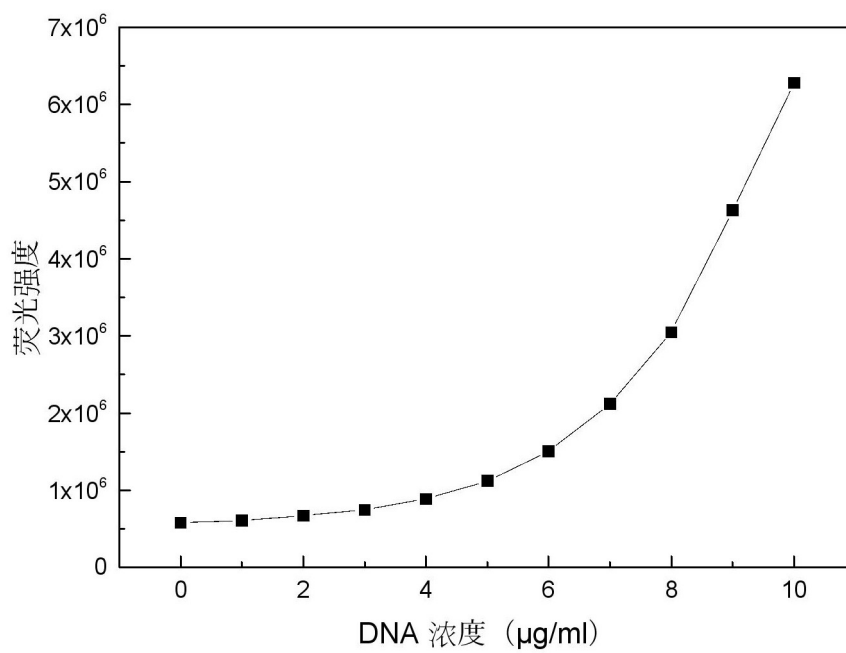


图3

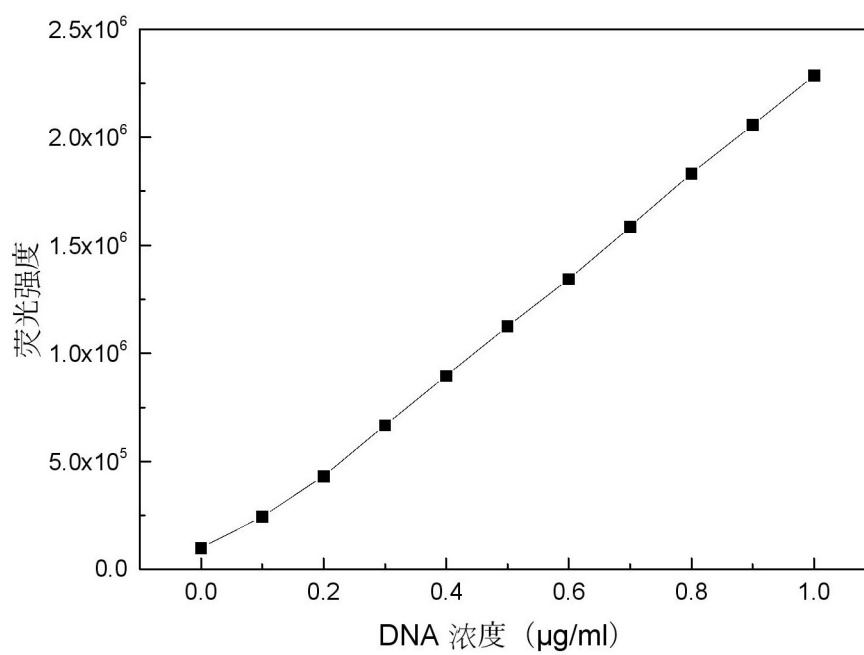


图4

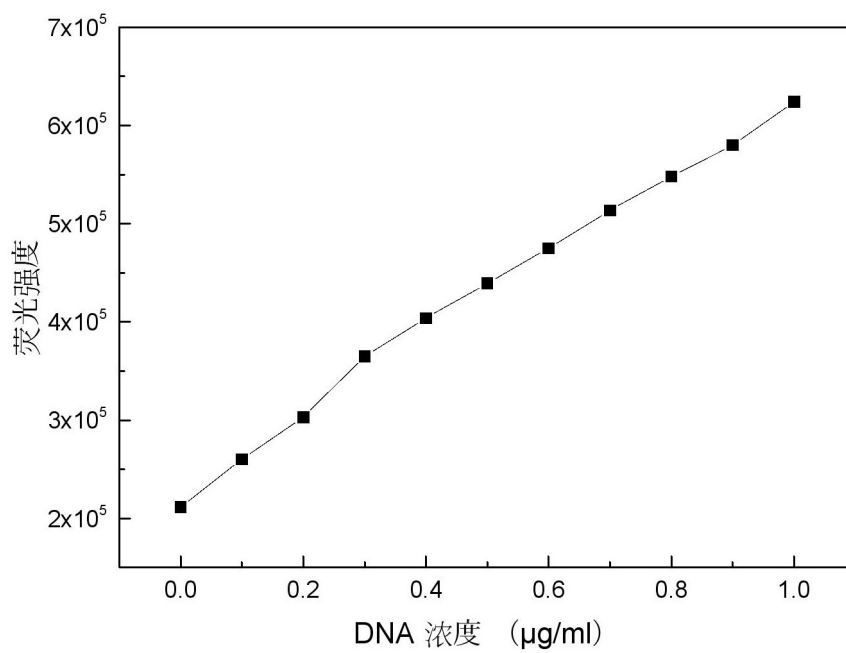


图5

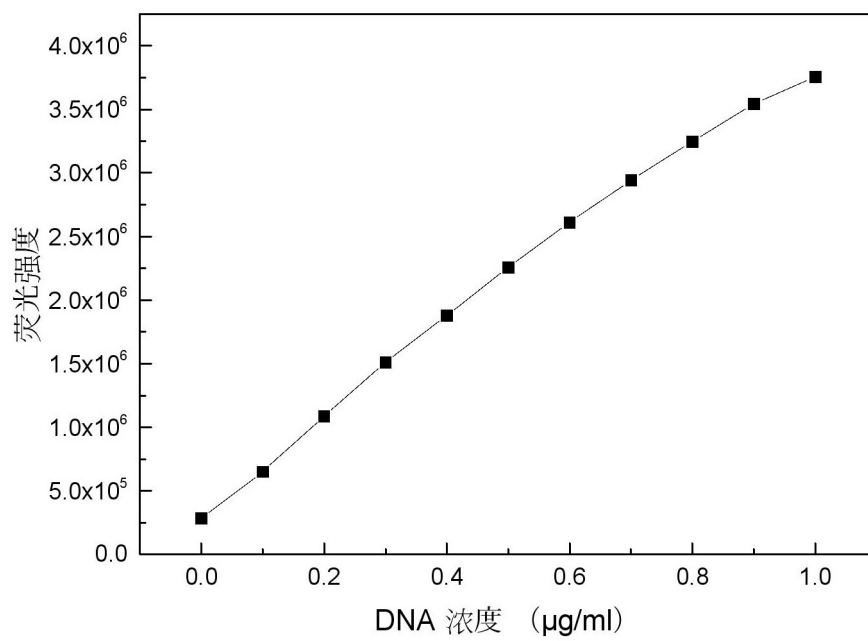


图6

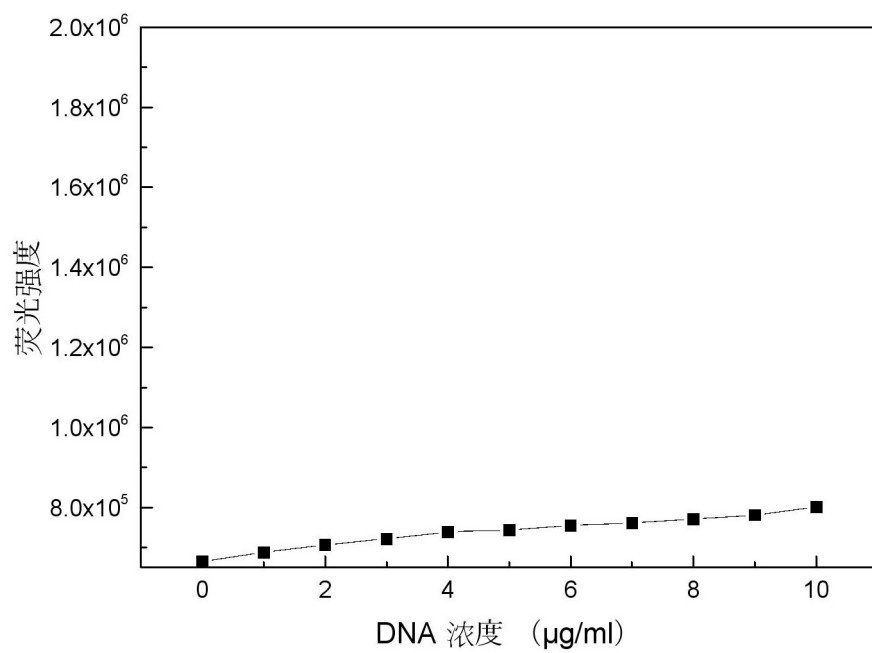


图7

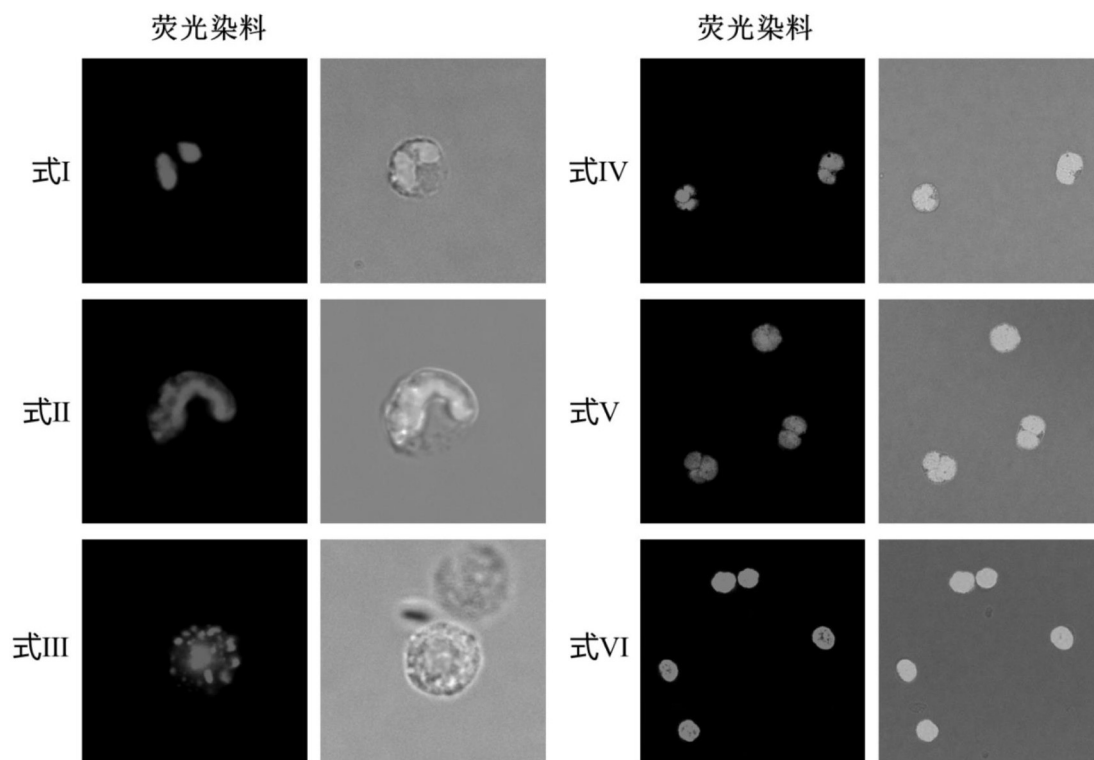


图8

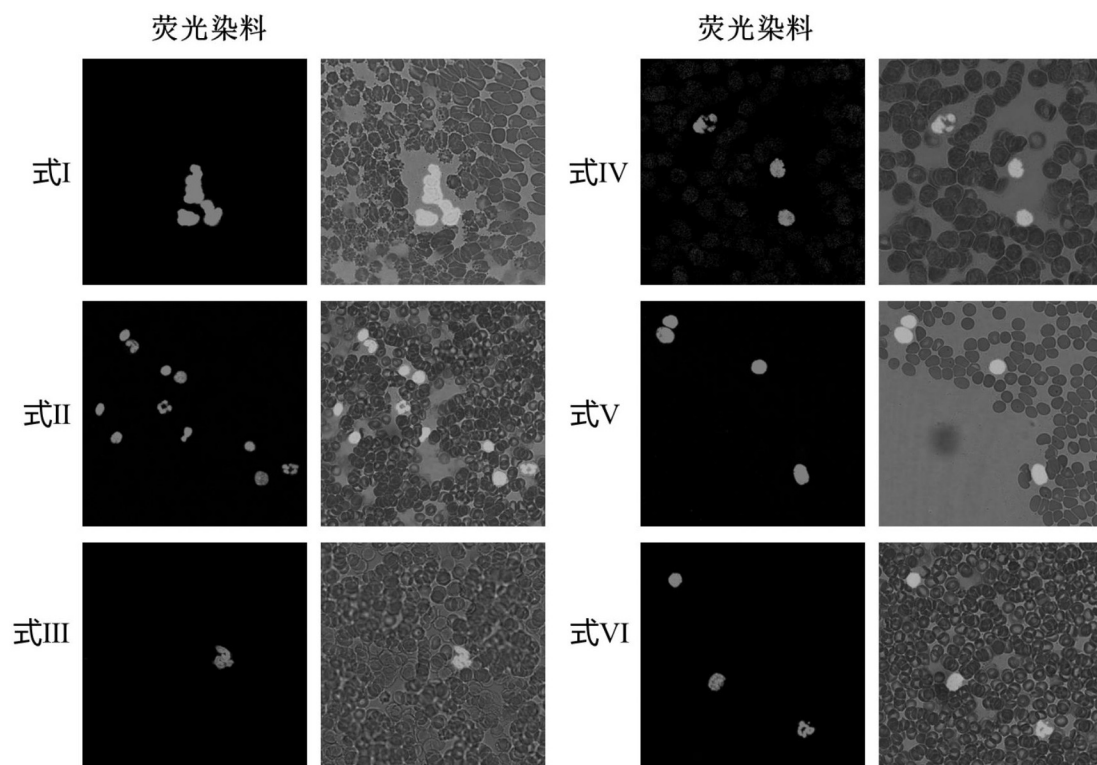


图9

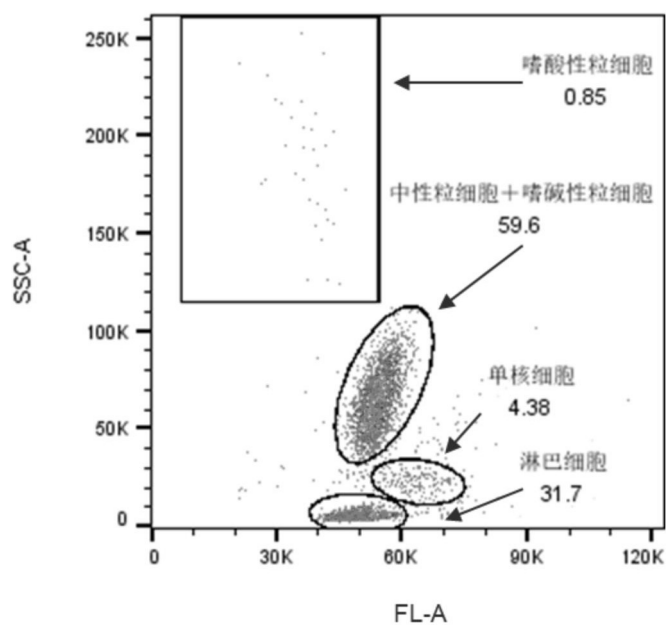


图10

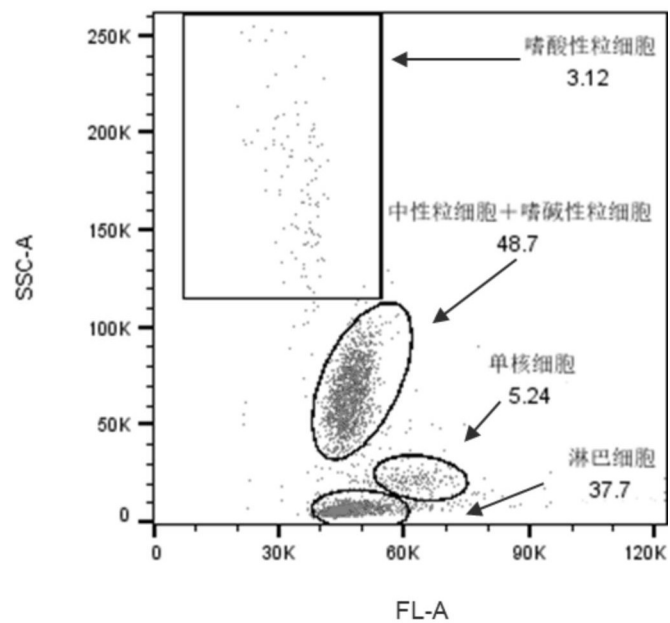


图11

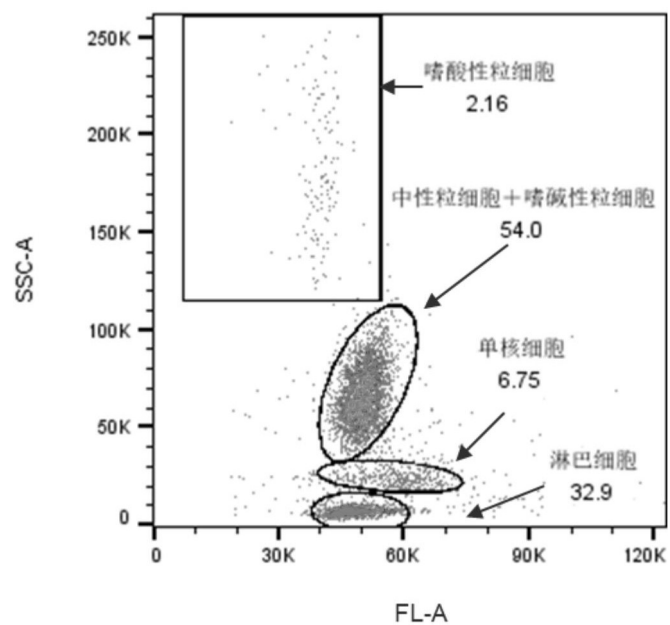


图12

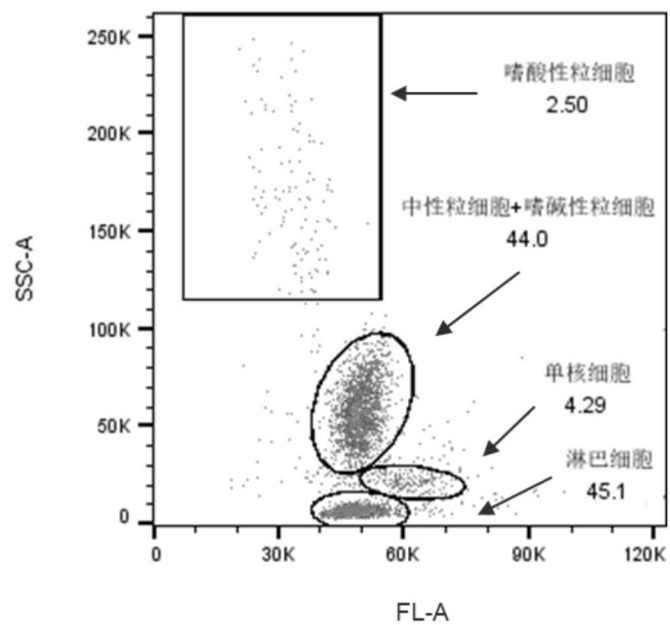


图13

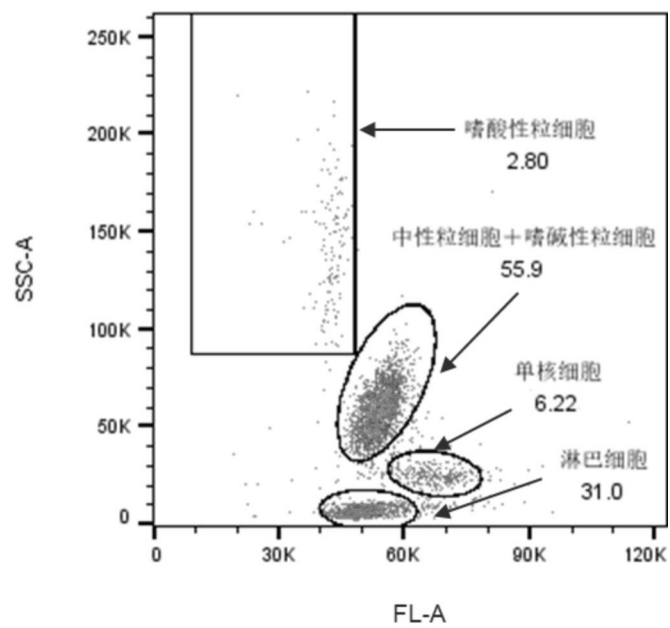


图14

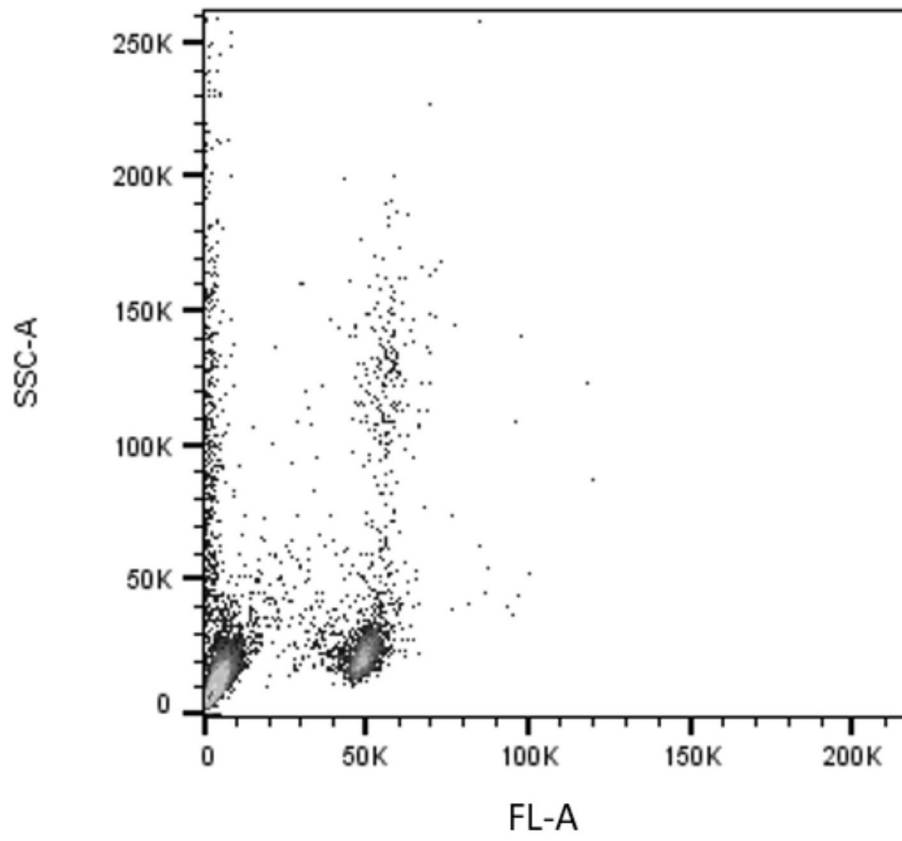


图15