



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101501497 B

(45)授权公告日 2017.06.09

(21)申请号 200780029610.2

(22)申请日 2007.07.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101501497 A

(43)申请公布日 2009.08.05

(30)优先权数据
11/501,395 2006.08.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2009.02.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2007/073870 2007.07.19

(87)PCT国际申请的公布数据
W02008/021653 EN 2008.02.21

(73)专利权人 贝克曼考尔特公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 安德烈亚斯·范阿格托万
法布里斯·马莱格

(74)专利代理机构 上海市华诚律师事务所
31210

代理人 傅强国 涂勇

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件
EP 0617281 B1,1994.09.28,权利要求1和3,第0025段第43行.

US 20040214243 A1,2004.10.28,第16、32-36段,权利要求3,9.

US 20040214243 A1,2004.10.28,第16、32-36段,权利要求3,9.

US 6271035 A,2001.08.07,参见 摘要,栏1行25,38,48,栏4行1,45,栏5行55.

US 20030025896 A1,2003.02.06,权利要求14-16,第3,14段.

US 6534279 A,全文.

审查员 杨光

权利要求书3页 说明书16页 附图5页

(54)发明名称

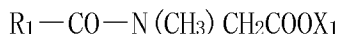
细胞血红蛋白的测试方法

(57)摘要

一种检测血液样本中细胞血红蛋白的方法,包括:将血液样本与渗透剂混合,并且孵育样品混合物以渗透红细胞的细胞膜并引起细胞内血红蛋白的聚集;添加中和剂以抑制渗透剂的进一步反应;在流式细胞仪上对样品混合物中的红细胞的侧散射信号进行逐个细胞测定;以及利用获得的侧散射信号得出每一个红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{细胞})。该方法进一步包括:利用同步荧光测试法分选网织红细胞,以测定网织红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{网织})。该方法还包括:通过向中和试剂中加入荧光抗体,并且探测结合于抗体的血红蛋白变体的荧光信号,测定成熟红细胞或网织红细胞中血红蛋白变体的细胞百分率。

1. 一种流式细胞分析的试剂系统,包括:

(a) 渗透剂水溶液,其包含有效量的由下列分子结构式表示的N-酰基肌氨酸或其盐:



其中R₁为含有8-18个碳原子的烷基或亚烷基,X₁为H、Na⁺、或K⁺;所述渗透剂水溶液的pH值在4-6之间,并具有由电导率确定的小于1.2mS/cm的低离子强度,以及240-280mOsm/kg H₂O的渗透压;其用于渗透血细胞的细胞膜并导致所述血细胞的侧散射信号的明显增加;和

(b) 中和试剂,其包含缓冲液和渗透压调节剂,用以抑制所述渗透剂与所述血细胞的进一步反应,其中所述中和试剂的渗透压是800-1200mOsm/kg H₂O。

2. 如权利要求1所述的试剂系统,其特征在于,进一步包含固定剂。

3. 一种测定血液样品中细胞血红蛋白的方法,包括以下步骤:

(a) 将一等分血液样品与权利要求1中所述的渗透剂水溶液混合,以形成第一样品混合物;将所述第一样品混合物孵育足以允许所述渗透剂水溶液渗透血红细胞的细胞膜并引起所述血红细胞内血红蛋白聚集的30秒-5分钟;

(b) 向所述第一样品混合物中加入权利要求1中所述的中和试剂,以形成第二样品混合物,并将所述第二样品混合物孵育足以抑制所述渗透剂水溶液与所述血红细胞发生进一步反应的5-30分钟;

(c) 在流式细胞仪上对所述第二样品混合物中的所述血红细胞的侧散射信号进行逐个细胞测定;和

(d) 利用所述侧散射信号获得所述血液样品中所述血红细胞的细胞血红蛋白Hgb_{细胞}。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,进一步包括:在所述流式细胞仪上进行所述测定之前,向所述第二样品混合物中加入固定剂以固定所述血红细胞。

5. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述渗透剂水溶液包含表面活性剂。

6. 一种测定血液样品中网织红细胞的细胞血红蛋白的方法,包含以下步骤:

(a) 将一等分所述血液样品与核酸染色剂混合以形成染色样品,其中,所述核酸染色剂是水溶液,所述核酸染色剂包含对RNA分子有特异性的荧光核酸染料、表面活性剂、和一种以上维持试剂渗透压的盐;将所述染色样品孵育足以允许所述荧光核酸染料与细胞内RNA结合的30秒-3分钟;

(b) 将一等分所述染色样品与权利要求1中所述的渗透剂水溶液混合以形成第一样品混合物;将所述第一样品混合物孵育足以允许所述渗透剂水溶液渗透成熟血红细胞和网织红细胞的细胞膜、并引起所述成熟血红细胞和网织红细胞内血红蛋白聚集的30秒-5分钟;

(c) 向所述第一样品混合物中加入权利要求1中所述的中和试剂从而形成第二样品混合物;将所述第二样品混合物孵育足以抑制所述渗透剂水溶液与所述成熟血红细胞和与网织红细胞发生进一步反应的5-30分钟;

(d) 在流式细胞仪上,对所述第二样品混合物中的所述成熟血红细胞和所述网织红细胞的侧散射信号和预定波长下的荧光信号进行逐个细胞测定;

(e) 利用所述荧光信号、或者结合所述荧光信号和所述侧散射信号将所述网织红细胞从所述成熟红细胞中分选出来;以及

(f) 利用侧散射测试获得到所述网织红细胞的细胞血红蛋白Hgb_{网织}。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,进一步包含:在所述流式细胞仪上进行所述

测定之前,向所述第二样品混合物中加入固定剂以固定所述网织红细胞。

8.如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述核酸染色剂包含吖啶橙。

9.如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述渗透剂水溶液包含表面活性剂。

10.一种确定血液样品中血红蛋白变体的细胞百分率的非疾病诊断或治疗的方法,包含以下步骤:

(a)将一等分所述血液样品与权利要求1中所述的渗透剂水溶液混合以形成第一样品混合物;将所述第一样品混合物孵育足以允许所述渗透剂水溶液渗透血红细胞的细胞膜并引起所述血红细胞内血红蛋白聚集的30秒-5分钟;

(b)向所述第一样品混合物中加入含有对所述血红蛋白变体有特异性的荧光抗体的权利要求1中所述的中和试剂,以形成第二样品混合物;将所述第二样品混合物孵育足以允许所述抗体与所述细胞膜内的血红蛋白变体结合、并抑制所述渗透剂水溶液与所述血红细胞发生进一步反应的5-30分钟;

(c)在流式细胞仪上,对所述第二样品混合物中的所述血红细胞的侧散射信号和预定波长下的荧光信号进行逐个细胞测定;

(d)利用步骤(c)中得到的所述荧光信号和所述侧散射信号获得所述血红细胞的细胞血红蛋白变体Hgb^{变体}和细胞血红蛋白Hgb^{细胞};以及

(e)利用步骤(d)中得到的所述Hgb^{变体}和Hgb^{细胞}获得所述血红蛋白变体的细胞百分率。

11.如权利要求10所述的方法,其特征在于,进一步包含:在所述流式细胞仪上进行所述的测定之前,向所述第二样品混合物中加入固定剂以固定所述血红细胞。

12.如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述血红蛋白变体包括糖基化血红蛋白、胎儿血红蛋白或血红蛋白的异常形式。

13.如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述血红蛋白变体为糖基化血红蛋白Hb_{A1c}。

14.如权利要求13所述的方法,其特征在于,所述荧光抗体为抗Hb_{A1c}抗体。

15.如权利要求14所述的方法,其特征在于,所述抗Hb_{A1c}抗体为单克隆抗Hb_{A1c}-Alexa Flour 647抗体。

16.一种测定血液样品中网织红细胞的血红蛋白变体的非疾病诊断或治疗的方法,包含以下步骤:

(a)将一等分所述血液样品与核酸染色剂混合以形成染色样品,其中,所述核酸染色剂是水溶液,所述核酸染色剂包含对RNA分子有特异性的荧光核酸染料、表面活性剂、和一种以上维持试剂渗透压的盐;将所述染色样品孵育足以允许所述荧光核酸染料与细胞内RNAs结合的30秒-3分钟;

(b)将一等分所述染色样品与权利要求1中所述的渗透剂水溶液混合以形成第一样品混合物;将所述第一样品混合物孵育足以允许所述渗透剂水溶液渗透成熟红细胞和网织红细胞的细胞膜并引起所述成熟红细胞和所述网织红细胞内血红蛋白聚集的30秒-5分钟;

(c)向所述第一样品混合物中加入含有对血红蛋白变体有特异性的荧光抗体的权利要求1中所述的中和试剂,以形成第二样品混合物;将所述第二样品混合物孵育足以允许所述抗体与所述细胞膜内的所述血红蛋白变体结合、并抑制所述渗透剂水溶液与所述成熟红细胞和与所述网织红细胞发生进一步反应的5-30分钟;

(d) 在流式细胞仪上,对所述第二样品混合物中的所述成熟红细胞和所述网织红细胞在两个预定波长下的荧光信号进行逐个细胞测定;以及

(e) 从所述成熟红细胞中分选出所述网织红细胞,并利用步骤(d)中得到的所述荧光信号获得所述网织红细胞的所述细胞血红蛋白变体Hgb_{变体-网织}。

17. 如权利要求16所述的方法,其特征在于,进一步包含:在所述流式细胞仪上进行所述的测定之前,向所述第二样品混合物中加入固定剂以固定所述网织红细胞。

18. 如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述核酸染色剂包含吖啶橙。

19. 如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述血红蛋白变体包括糖基化血红蛋白、胎儿血红蛋白或血红蛋白的异常形式。

20. 如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述血红蛋白变体为糖基化血红蛋白HbA_{1c}。

21. 如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述荧光抗体为单克隆抗HbA_{1c}抗体。

22. 如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述逐个细胞测定进一步包含对所述第二样品混合物中的所述成熟红细胞和所述网织红细胞的侧散射信号的测定;所述方法进一步包含:利用所述侧散射信号获得所述网织红细胞的细胞血红蛋白Hgb_{网织};以及利用所述Hgb_{变体-网织}和所述Hgb_{网织}获得所述网织红细胞中所述血红蛋白变体的细胞百分率。

23. 如权利要求22所述的方法,其特征在于,所述逐个细胞测定进一步包含:利用步骤(d)中得到的在所述预定波长中的一个波长下的所述荧光信号获得所述成熟红细胞的所述细胞血红蛋白变体Hgb_{变体}。

24. 如权利要求23所述的方法,其特征在于,所述逐个细胞测定进一步包含:利用所述侧散射信号获得所述成熟红细胞的细胞血红蛋白Hgb_{细胞};以及利用所述成熟红细胞的所述细胞血红蛋白变体Hgb_{变体}和所述细胞血红蛋白Hgb_{细胞}获得所述成熟红细胞中所述血红蛋白变体的细胞百分率。

细胞血红蛋白的测试方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请是于2005年2月7日递交的申请序列号为11/052,269的部分继续申请,将其全部内容并入本文以作参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种检测单个成熟红细胞和网织红细胞中细胞血红蛋白和血红蛋白变体的方法。

背景技术

[0003] 血红细胞中的细胞血红蛋白是临床诊断中的一项重要参数。在血细胞分析仪中,血液样本的平均红细胞血红蛋白(MCH)通过血液样本中的血红细胞数(RBC)和总血红蛋白(Hgb)得到。后者通过分光光度法测量裂解的血样本中血红蛋白的浓度得到。MCH是对所有血红细胞的平均测量值,它不能代表单个血红细胞中血红蛋白的含量。

[0004] 相比之下,在流式细胞仪上进行的对细胞血红蛋白的测量是逐个细胞(cell-by-cell)的测量,提供了不能从MCH中获得的诊断信息。Campbell等人在Cytometry 35, pp 242-248 (1999)中公开了利用荧光抗血红蛋白A抗体对单个红细胞中的血红蛋白的流式细胞分析。Burshteyn等人(美国专利申请公开号2004/0214243)公开了利用Anti-Pan-血红蛋白抗体对单个血红细胞中血红蛋白进行的流式细胞分析。由于血红细胞中有非常高浓度的血红蛋白,利用抗体测量总细胞血红蛋白就需要大量的荧光抗体。更进一步的,由于抗体结合的空间位阻或者由于细胞中高密度的血红蛋白引起的荧光猝灭,会导致潜在伪像。因此,这就需要找到一种不依赖抗体的测定总细胞血红蛋白的方法。

[0005] 另一方面,在利用多角度光散射(multi-angle light scatter)检测的血液学分析领域中发展了逐个细胞的血红蛋白的检测方法。为了促进光散射测量,典型地,对血液样品用等渗的中性球形化试剂进行处理,使血液红细胞在测量之前变为球形。利用光散射法测量未处理的血红细胞时,由于形状凸凹的细胞通过流动室时会有各种不同的方向性,它们会产生非均一的散射结果。与球形化试剂混合后,血红细胞变为球形,就会产生均一的散射结果。但是,用于确定细胞血红蛋白的光散射测量方法是复杂的,特别是需要利用多个光散色信号的角度。例如,Bayer公司的血液析仪对血红细胞所做的逐个细胞测试就利用了一种基于Mei理论的复杂光散射测量法。尽管所有商业销售的流式细胞仪都装备了前(forward)和侧散射(side scatter)测定装置,但是球形化的血红细胞的前散射和侧散射信号并不与细胞血红蛋白相关联,因此也不能用于细胞血红蛋白的定量测定。而且,经过球形化试剂处理后的血红细胞不能渗透大的细胞内标志物,比如抗体,因此,也就不适合于利用抗体测量血红蛋白变体的方法。

[0006] 对血红蛋白的变体和异常形态进行鉴别和/或定量,这对各种疾病,例如,镰刀形细胞疾病、地中海贫血、和糖尿病的临床诊断有重要意义。对于血红细胞A_{1c}的测量已经是最常用的血红细胞变体测量之一,也是糖尿病患者非常重要的临床测量。

[0007] 已知总血红蛋白的90%是非糖基化的。非糖基化的血红蛋白的主要部分是非糖基化的HbA₁,称为HbA₀。糖基化的血红蛋白指一系通过各种糖链附着于血红蛋白分子而形成的次要的血红蛋白组分。糖可以自由渗透入红血球。每一个红血球内,糖基化血红蛋白的形成速度直接与周围的糖浓度成正比。糖与血红蛋白的反应是非酶促反应,不可逆且缓慢,所以在红血球的生命周期内(120天),总血红蛋白只有一部分是被糖基化。因此,糖基化血红蛋白的测定提供了一个有利的“变化着的”平均血糖水平,可用于监控长期血糖水平,提供了一个反映之前2到3个月的平均血糖水平的精确的指数。该测定方法的最重要临床应用在于评估糖尿病患者体内血糖控制。

[0008] 血红蛋白A_{1c}(HbA_{1c})是糖基化血红蛋白中一种特殊的类型,是与糖尿病相关的最重要的血红蛋白种类。在非糖尿病患者体内,HbA_{1c}占总血红蛋白的约3-6%,而在没有控制的糖尿病患者体内占约20%(Goldstein,et al.,Clin.Chem.32:B64-B70,1986)。对HbA_{1c}浓度的确定对于诊断和检测糖尿病很有帮助。

[0009] 基于以上论述,有必要找到一种方法,能够同时测定单个红细胞中总血红蛋白含量以及特定的血红蛋白变体含量。此外,进一步的,有必要找到一种方法,能对不同的红细胞亚群,例如可以在成熟红细胞中、同时也可以在网上红细胞中,同时地进行逐个细胞测定。

发明内容

[0010] 在一个实施方式中,本发明针对一种测定血液样本中细胞血红蛋白的方法。该法包括:将血液样本与渗透剂混合以形成第一样品混合物;将第一样品混合物孵育足以渗透血红细胞的细胞膜并且引起细胞内血红蛋白的聚集的第一段时间;向第一样品混合物中加入中和试剂以形成第二样品混合物,并将该第二样品混合物孵育足以抑制渗透剂与血红细胞的进一步反应的第二段时间;在流式细胞仪上对第二样品混合物中血红细胞的侧散射信号(side scatter signal)进行逐个细胞测定;以及利用侧散射信号获得血液样本中血红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{细胞})。该方法进一步包括:在流式细胞仪上进行测定之前,向第二样品混合物中加入固定剂以固定血红细胞。

[0011] 在另一个实施方式中,本发明针对一种测定血液样本中网织红细胞的细胞血红蛋白的方法。该法包括:将等分血液样本与核酸染料混合以形成染色样品,并将该染色样品孵育足以允许染料与细胞内RNA结合的第一段时间;将等分染色样本与渗透剂混合以形成第一样品混合物;并且将第一样品混合物孵育足以使渗透剂透过成熟血红细胞和网织红细胞的细胞膜、并引起细胞内血红蛋白的聚集的第二段时间;向第一样品混合物中加入中和试剂以形成第二样品混合物;将该第二样品混合物孵育足以抑制渗透剂与成熟血红细胞和网织红细胞的进一步反应的第三段时间;在流式细胞仪上对第二样品混合物的中成熟血红细胞和网织红细胞的侧散射信号和指定波长下的荧光信号进行逐个细胞测定;利用荧光信号、或者荧光信号与侧散射信号的结合信号,将网织红细胞从成熟血红细胞中分选出来;以及利用侧散射测定得出网织红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{网织})。

[0012] 在另一个实施方式中,本发明针对一种确定血液样本中血红蛋白变体的细胞百分率(cellular percentage)的方法。该方法包括:将等分血液样品与渗透剂混合以形成第一样品混合物;将第一样品混合物孵育足以使渗透剂透过红细胞的细胞膜、并且引起细胞内

的血红蛋白的聚集的第一段时间;向第一样品混合物中加入含有对血红蛋白变体特异的抗体的中和试剂,以形成第二样品混合物;将第二样品混合物孵育足以使抗体与细胞内的血红蛋白变体结合、并且抑制渗透剂与血红细胞的进一步反应的第二段时间;在流式细胞仪上对第二样品混合物中的红细胞的侧散射信号和指定波长下的荧光信号进行逐个细胞测定;利用得到的侧散射信号和荧光型号,获得红细胞中细胞血红蛋白变体(Hgb_{变体})和细胞血红蛋白(Hgb_{细胞});利用所得Hgb_{变体}和Hgb_{细胞}得到血红蛋白变体的细胞百分率。所述血红蛋白变体包括糖基化血红蛋白、胎儿血红蛋白、或血红蛋白的异常形态。

[0013] 而在在一个实施方式中,本发明针对一种测定血液样本中网织红细胞的细胞血红蛋白变体的方法。该方法包括:将等分血液样品与核酸染料混合以形成染色样品,将该染色样品孵育足以允许染料与细胞内RNAs结合的第一段时间;将等分染色样品与渗透试剂混合,以形成第一样品混合物;将第一样品混合物孵育足以使渗透试剂透过成熟红细胞和网织红细胞、并且引起细胞内血红蛋白的聚集的第二段时间;向第一样品混合物中加入含有对血红蛋白变体特异的抗体的中和试剂,以形成第二样品混合物;将第二样品混合物孵育足以使抗体与细胞血红蛋白结合、并且抑制渗透剂与成熟红细胞和网织红细胞的进一步反应的第三段时间;在流式细胞仪上对第二样品混合物中的成熟红细胞和网织红细胞进行两种指定波长下的荧光信号逐个细胞测定;以及将网织红细胞从成熟红细胞中分选出来,并且利用荧光信号得到网织红细胞中的细胞血红蛋白变体。

[0014] 逐个细胞的测定还可以进一步包括对第二样品混合物中成熟红细胞和网织红细胞的侧散射信号的测定。该方法还可以进一步包括:利用侧散射信号获得网织红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{网织});以及利用细胞血红蛋白变体和Hgb_{网织}获得网织红细胞的血红蛋白变体的细胞百分率。

[0015] 另一方面,本发明针对一种流式细胞分析试剂系统,它包含:用于渗透血细胞细胞膜并引起血细胞内的血红蛋白聚集的渗透剂水溶液;和中和试剂,其包含缓冲液和用于抑制渗透剂与血细胞反应的渗透压调节试剂。该试剂系统可以进一步包含一种固定剂。所述渗透剂包含有效量的N-酰基肌氨酸或其盐;该试剂的pH值在4-6之间,且由电导性确定的低离子强度小于9.0mS/cm。

[0016] 以下描述及其附图可以更清楚地体现本发明的优点。

附图说明

[0017] 图1显示了渗透剂对血液不同部分中的蛋白的沉淀作用:上左,血清;上右,胎牛血清蛋白;底部左,细胞可溶部分;底部右,细胞膜部分。

[0018] 图2A和2B分别显示了利用本发明的方法和利用球形化试剂处理后获得的血液样品的前散射对侧散射(对数值坐标)的散点图。

[0019] 图3A显示了利用即时方法测得的16个血液样本的平均侧散射值(标记为细胞计量(Cytometric)SS)与相同血液样本的由血细胞分析仪得出的MCH值之间的线性相关曲线。图3B显示了平均侧散射值与相同血液样本利用球形化试剂处理后得到的MCH值之间的线性相关曲线。

[0020] 图4A显示了利用本发明的一个实施方式中的方法测得的血液样本的侧散射对FL1(对数值)的散点图。图4B是相同血液样本没有经过核酸染色试剂处理时的散点图。

[0021] 图5A和图5B分别显示了血液样本的侧散射对FL1(对数值)以及FL1对FL4(半对数值)的散点图,它们来自为了单独地测定成熟红细胞和网织红细胞的HbA_{1c}而对侧散射和两个指定波长下的荧光进行的同时测定。

具体实施方式

[0022] 一方面,本发明提供了一种利用侧散射测量法来测定血液样本中细胞血红蛋白的方法。此处,细胞血红蛋白为单个的血红细胞内的血红蛋白含量(pg)。细胞血红蛋白(Hgb_{细胞})由于通过逐个细胞测量法获得,故也常被称为逐个细胞的血红蛋白。

[0023] 在一个实施方式中,该方法包括以下步骤:(a)将等分血液样本与渗透试剂混合以形成第一样品混合物;将所述第一样品混合物孵育足以渗透血红细胞的细胞膜并引起细胞内的血红蛋白聚集的第一段时间;(b)向第一样品混合物中加入中和试剂以形成第二样品混合物,并将所述第二样品混合物孵育以抑制渗透试剂与血红细胞的进一步反应的第二段时间;以及(c)在流式细胞仪上对第二样品混合物中血红细胞的侧散射信号进行逐个细胞测试;以及(d)利用测试获得的侧散射信号,得出血红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{细胞})。

[0024] 优选地,该方法进一步包括:在逐个细胞测试之前,向第二样品混合物中加入固定剂以固定血红细胞。

[0025] 此处用到的渗透试剂也可以被称为细胞透化试剂和细胞稳定剂,它在流式细胞测定中所起的渗透细胞膜及保护细胞组分的作用已经在序列号为11/052,269的待审申请中描述过,将其全部内容并入本文以作参考。

[0026] 在一个实施方式中,所述渗透剂为水溶液,包含由下述分子结构式表示的N-酰基肌氨酸或其盐: $R_1-CO-N(CH_3)CH_2COOX_1$ 其中R₁为含有8-18个碳原子的烷基或亚烷基基团,X₁为H、Na⁺、或K⁺、以及可将试剂pH值调节为小于7的pH调节剂。所述渗透剂优选为弱酸性,其pH值范围为4-6。更优选地,试剂的pH值为约4.6-5.6。

[0027] 优选地,所述pH调节剂为强碱或强酸,这样,少量的化学物质即可调节pH值到所需范围。在一个优选实施方式中,使用了游离N-酰基肌氨酸,并且强的有机碱吡咯烷、或强的无机碱NaOH被用于调节pH值在4-6之间。如果使用N-酰基肌氨酸盐,那么可用强酸例如HCl用于校正pH。更进一步地,有机缓冲液可用于维持pH。在一个典型的实施方式中,使用了pK_{a1}为4.19、pK_{a2}为5.57的琥珀酸。

[0028] 所述渗透剂具有低离子强度,限定为电导率低于9.0mS/m。但是,它只是轻微的低渗,其渗透压为约240-280mOsm/Kg H₂O。

[0029] 研究发现,当细胞暴露于渗透剂时,在低离子强度条件下细胞内蛋白更易于聚集。为了达到本发明目的,水溶液试剂组合物的离子强度通过试剂的电导率进行限定。据信细胞内蛋白的聚集对于在渗透之后保持细胞的完整性是必需的。当离子强度太高时,例如当试剂的电导率高于9mS/cm时,试剂不再能引起细胞内蛋白的聚集,细胞也失去其完整性。优选地,所述渗透剂电导率小于1.2mS/cm。由于离子型化合物,例如盐,是试剂中离子强度的主要贡献者,故优选试剂具有低盐浓度。

[0030] 游离酸形态的N-酰基肌氨酸及其盐可以商购。优选采用不会向试剂中引入金属离子的游离酸形态。游离酸形态的N-酰基肌氨酸不溶于水。可以先预溶于乙醇溶液,然后加入水溶液。当pH调节剂将试剂的pH调节到4-6之间时,N-酰基肌氨酸即可溶解,并以阴离子形

式存在于溶液中。

[0031] N-酰基肌氨酸的合适例子包括：N-油酰肌氨酸、N-硬脂酰肌氨酸、N-月桂酰肌氨酸、N-肉豆蔻酰肌氨酸、N-椰油酰肌氨酸、及其盐。优选R₁为含12个碳原子的烷基或亚烷基基团。在一个优选实施方式中，使用N-月桂酰肌氨酸。

[0032] 在进一步的实施方式中，所述渗透剂可以进一步包含如下结构式所示的阴离子表面活性剂：R₂-O-SO₃X₂其中R₂为含有8-18个碳原子的烷基或亚烷基基团；X₂为Na⁺、K⁺、NH₄⁺、或NH₂C(CH₂OH)₃（即三羟甲基氨基甲烷）。阴离子表面活性剂中的R₂优选是含有12个碳原子的烷基或亚烷基基团。适于使用的例子包括钠盐、钾盐、铵盐以及三羟甲基氨基甲烷月桂醇硫酸盐。在一个优选实施方式中，使用了三羟甲基氨基甲烷月桂醇硫酸盐，文中以下简称Tris月桂醇硫酸盐。

[0033] 在渗透试剂中，N-酰基肌氨酸或其盐、或者与烷基/亚烷基硫酸盐表面活性剂的组合物以有效的量存在，以使试剂能够渗透过细胞膜，并且能使细胞内标记物透过，同时又基本上保护细胞膜和细胞成分与它们的用于流式细胞仪分析的细胞标记物的特异性结合。已发现两种表面活性剂的浓度范围都可以在约0.01mM至100mM的范围内，优选0.1mM至10mM，更优选1mM至5mM。在一个示例性的实施方式中，使用2.3mM的N-月桂酰肌氨酸。在另一个实施例中，使用0.5mM Tris月桂醇硫酸盐和2.2mM N-月桂酰肌氨酸的混合物。

[0034] 上述浓度的表面活性剂具有可引起多肽和蛋白在弱酸性pH值下聚集的特性，同时不会使细胞内抗原位点变性，也不会损伤细胞膜。

[0035] 优选地，所述渗透剂进一步包含胎牛血清蛋白(BSA)。牛血清蛋白增强了表面活性剂在水溶液中的溶解性，并有利于渗透剂的长期存放和使用。

[0036] 任选地，渗透剂可以进一步包含有机渗透压调节剂。适用的有机渗透压调节剂例子包括，但不限于：糖类，乙二醇，二甲亚砜，或甘油。优选使用糖或甘油。所述糖类可以为多糖例如二糖，或单糖。在实施例1中组合物D所示的示例性实施方式中，使用蔗糖。

[0037] 更进一步地，渗透剂可以进一步包含一种或多种防腐剂。适用的例子包括抗菌剂和抗氧化剂，用于延长试剂的保存期。防腐剂的量以不影响试剂功能为限。在一个实施方式中，5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮被用做防腐剂。罗门哈斯公司(Rohm and Hass, 费城, 宾夕法尼亚州)生产的5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的组合物可以商购，其商品名为Proclin®150和Proclin®300。

[0038] 实施例1显示了本发明渗透剂的四种示例性组合物。

[0039] 研究发现，当与血细胞混合后，本发明的渗透剂可以有效地渗透细胞膜，使细胞内标记物能够渗透入细胞内，以利于随后的细胞分析；该渗透剂还可以引起细胞内蛋白在细胞内的聚集。同时，该渗透剂又保护了细胞内成分诸如细胞内的及细胞表面的抗原位点、DNA及RNA分子、以及用于与细胞内标记物结合的细胞骨架。渗透时，血红细胞也变为球形，这就使得对血红细胞的侧散射测量更为精确，不受细胞形状和定向的影响。

[0040] 为了本发明的目的，术语“细胞成分”包括位于细胞内以及位于细胞膜表面的细胞组分，例如细胞表面抗原位点。而术语“细胞内成分”是指位于细胞内的细胞组分，其包括但不限于细胞内蛋白，例如血红蛋白、血红细胞内的血红蛋白变体、细胞骨架成分、DNA和RNA。细胞骨架成分包括，但不限于微管蛋白和血影蛋白。此处所用术语“细胞内标记物”包括，但不限于：对细胞内蛋白的抗原位点、细胞表面抗原位点、或细胞骨架成分具有特

异性的抗体；核酸染料和对DNA或RNA分子具有特异性的核酸探针，例如寡核苷酸探针。优选地，细胞内标记物带有荧光染料标记。进一步地，可对细胞内成分特异的细胞标记物也称为细胞内标记物。

[0041] 利用实施例1中的成分C，实施例6显示了渗透剂对蛋白聚集的影响。图1显示了实施例6中描述的渗透试剂对血清组分、可溶细胞内成分（细胞溶质）和细胞膜制剂沉淀过程的影响。在每个制剂中，没有胎牛血清蛋白时，由于蛋白聚集作用，细胞成分与渗透试剂混合物的光密度明显增加。由于可溶细胞部分中有高浓度的血红蛋白，在可溶细胞部分中光密度增加得最多。应注意，光密度是在650nm处测得的，血红蛋白在此处没有吸收。因此，光密度的增加是由于混合物的不透光性造成的。在细胞膜部分中，不透光性增加得较少，这可以理解为细胞膜表面的脂质部分的溶解掩盖了结果。进一步地，该实施例显示，渗透剂中有胎牛血清蛋白时，例如在实施例1中的成分D中，不会影响样品混合物的不透光性。

[0042] 优选的，血液样本与渗透剂的混合稀释比例为约200:1-8000:1。血液样本与渗透剂混合孵育一段时间以促进渗透剂与细胞的反应。优选地，孵育时间为约30秒至5分钟，更优选地，为约2-3分钟。

[0043] 此后，渗透反应通过加入中和试剂而终止。该中和试剂为高渗的和本质上中性的，其pH值为略高于7.0。当与第一样品混合物混合后，中和试剂将混合样品的pH变为中性，并增加了混合样品的离子强度和渗透压。这样，它就有效地抑制了渗透试剂的进一步反应。

[0044] 中和试剂包含渗透压调节剂和缓冲液。优选地，渗透压调节剂为一种或多种碱金属盐，优选碱金属卤化物，例如氯化钠或氯化钾。中和试剂的渗透压优选为约800-1,200mOsm/Kg H₂O。缓冲液可以为有机或无机的缓冲液，能够提供中性的pH。中和试剂的pH优选为约7.1-7.5，更优选为约7.2-7.4。

[0045] 更进一步地，中和试剂可以进一步包含胎牛血清蛋白。胎牛血清蛋白可帮助维持细胞组分的完整性，特别是细胞内抗原位点例如糖基化血红蛋白（HbA_{1c}）或胎儿血红蛋白（HbF）的抗原位点，以保护它们与各自抗体的结合。优选地，胎牛血清蛋白的浓度为约0.4-1.2mM。

[0046] 此外，中和试剂进一步包含杀菌剂。在一个典型的实施方式中，使用了叠氮化钠。叠氮化钠为一种强杀菌剂，特别适合用于pH为中性并含有高浓度胎牛血清蛋白的中和试剂中。实施例2描述了中和试剂的示例性组合物。

[0047] 优选地，正如实施例2所示，中和试剂与渗透剂的使用比例为约1.5-1.8。加入中和试剂后，形成的第二样品混合物进一步孵育一段时间，以有效终止渗透剂的反应并稳定混合样品。孵育时间优选约5-30分钟，更优选约8-12分钟。此后，第二样品混合物可以被装备了侧散射探测仪器的流式细胞仪吸入并进行检测。

[0048] 在测量特定的血红蛋白变体时，例如在测定下述的HbA_{1c}时，可以将所研究的血红蛋白变体的特异性抗体加入中和试剂中。由于细胞膜被渗透试剂所渗透，这些大的抗体分子可以透过细胞膜并与细胞内蛋白的抗原位点结合。

[0049] 典型地，样品混合物在流式细胞仪上采用批次方式检测。制备的样品混合物在测量前可能需等待一段足够的时间，例如，两个小时。因此，在即时方法中，可以进一步向第二样品混合物中加入固定剂以固定细胞。

[0050] 固定剂中包含固定化剂、渗透压调节剂和缓冲液。优选地，固定化剂为一种醛，包

含但不仅限于：甲醛，多聚甲醛，戊二醛。所述渗透压调节剂可以是一或多中碱金属盐，优选碱金属卤化物，例如氯化钠或氯化钾。优选地，所述固定剂为高渗的，其渗透压为约1,100-1,400mOsm/Kg H₂O。所述缓冲液可以是提供中性pH的有机或无机缓冲液。所述固定剂的pH可以为约6.9-7.3，中和试剂可以维持中性pH。

[0051] 更进一步地，优选固定剂进一步包含螯合剂，例如硫酸葡聚糖、EGTA、和硼酸。研究发现，在固定剂中联合使用硫酸葡聚糖、EGTA和硼酸比通常采用的包含甲醛和磷酸盐缓冲液的固定剂能更有效地在最终的样品混合物中防止细胞聚集。实施例3显示了所述固定剂的示例性组合物。

[0052] 正如此前所述，本发明提供了一种试剂系统，用于制备在流式细胞仪上测定血红蛋白及其变体的血液样本。此试剂系统包含前述的渗透剂和中和剂，优选进一步包含固定剂。

[0053] 实施例7描述了本发明的利用侧散射测定法测量细胞血红蛋白的方法。此处，为流式细胞测定中公知的术语“侧散射信号”，是指当粒子或血细胞从细胞流动孔中通过时产生的、在发射光的右方约90度角或直角处的光侧散射信号。前散射(forward scatter)信号是指距发射光小于10度角范围内检测到的光散射信号。术语“侧散射测定”是指利用可见光探测仪检测侧散射信号。所有可商购的流式细胞仪都装备了能够检测前散射和侧散射信号的探测系统。

[0054] 应注意，在实施例7中，在加入渗透剂之前，球形化试剂被加入血液样品中。从本发明后叙的进一步的实施方式可以了解到，在网织红细胞的细胞血红蛋白测定中，网织红细胞的细胞核被染色。这可以通过使用球形化试剂为基质的核酸染色剂完成。为了提供一种便于测定成熟红细胞和网织红细胞的细胞血红蛋白的常用的样品制备方法，在先于血液样品与渗透剂的反应之前使用球形化试剂。但是，应该理解，在测定血液样品的细胞血红蛋白时，如果不需要分选网织红细胞，就不需要加入球形化试剂，因为如上所述，本发明中的渗透试剂本身可将红细胞球形化。

[0055] 如研究所示，利用本发明的方法制备了16个临床全血样品。制备的样品混合物在FC500MPL流式细胞仪上进行分析。所得一种血液样品的前散射对侧散射的散点图如图2A所示。在该散点图中，检测的血细胞中的大多数为处理过的红细胞。每个样品的平均侧散射值都在此种群中获得。

[0056] 为了对比，这16个样品的另一部分利用球形化试剂进行了处理，而没有用本发明的试剂系统进行处理。将4 μ l的血液样品与200 μ l实施例4中的球形化试剂混合。孵育1min后，将3 μ l悬浮液与240 μ l磷酸盐缓冲液(PBS)混合形成球形化试剂。球形化的样品在FC500MPL流式细胞仪上进行分析。图2B显示了与图2A中相同血液样品的前散射对侧散射的散点图。

[0057] 如图所示，利用本发明的方法得到的血液样品的平均侧散射值本质上高于利用球形化试剂和PBS处理得到的值。在这16个血液样品中，利于本发明方法得到的平均侧散射信号平均高了4-5倍。

[0058] 这16个血液样本还在Sysmex XE 2100血细胞分析仪上进行了分析。由分析仪报告的红细胞因子得出每个样品的平均血球血红蛋白(MCH)。应注意，在血细胞分析仪中，MCH(皮克)是通过溶解的血液样品中总血红蛋白浓度(Hgb, g/dl)和血液样品中的红细胞计数

(RBC, 个/升) 而计算得出的。

[0059] 独立地分析了由两等分样品得出的平均侧散射值与在血细胞分析仪上得出的MCH之间的相关性。图3A和图3B显示了线型相关性分析的结果。如图3A所示, 利用本发明的方法得到的侧散射值与MCH有很好的相关性, 其相关系数(r^2)为0.9202。这表明利用本发明的方法测得的侧散射信号是对血红细胞的细胞血红蛋白的直接测量。相反, 如图3B所示的利用球形化试剂处理过的平均散射值与MCH的相关性很低, 相关系数(r^2)为0.2812。

[0060] 可以理解, 在得到细胞血红蛋白时, 血液样品的血红蛋白浓度可以通过Hgb_{细胞}乘以血红细胞数而得到。后者可以单独获得, 如果流式细胞仪具有利于计数的流量测定装置, 也可以与前述的测定一起获得。

[0061] 应理解, 此处描述的细胞血红蛋白(Hgb_{细胞})是在单个血红细胞中的血红蛋白量, 包括该细胞中所有血红蛋白的变体。进一步的, 血液样品的平均侧散射值是指被测的血样中所有血红细胞包括成熟血红细胞和未成熟血红细胞如网织红细胞的侧散射信号值。

[0062] 另一方面, 本发明提供了一种测定血样中网织红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{网织})的方法。此处, 术语“网织红细胞的细胞内血红蛋白(Hgb_{网织})”是指在单个网织红细胞中的总血红蛋白, 包括该细胞中的所有血红蛋白变体。网织红细胞的细胞血红蛋白也常被称为网织红细胞细胞血红蛋白(CHR), 是Advia®120血细胞分析仪(拜耳诊断技术公司, TarryTwon, 纽约)的报告参数之一。

[0063] 为了测定网织红细胞的细胞血红蛋白, 必须将网织红细胞从作为红细胞主要成分的成熟红细胞中分选出来。本发明的方法, 正如此后详细描述, 提供了一种在流式细胞仪上利用一个步骤的信号测量来分选网织红细胞、并测定网织红细胞中细胞血红蛋白的方法。

[0064] 在一个实施方式中, 测定网织红细胞中细胞血红蛋白的方法包含下述步骤:

[0065] (a) 将一等分血液样本与核酸染色剂混合以形成染色样品, 并且将染色样品孵育足以允许染色剂与细胞内RNAs结合的第一段时间;

[0066] (b) 将一等分染色样本与渗透剂混合以形成第一样品混合物; 将第一样品混合物孵育足以使渗透剂渗透成熟红细胞和网织红细胞的细胞膜、并引起细胞内的血红蛋白聚集的第二段时间;

[0067] (c) 向第一样品混合物加入中和试剂, 以形成第二样品混合物; 将第二样品混合物孵育足以抑制渗透剂与红细胞的进一步反应的第三段时间;

[0068] (d) 在流式细胞仪上, 在预定的波长下对第二样品混合物的成熟红细胞和网织红细胞的侧散射信号和荧光信号进行逐个细胞测定;

[0069] (e) 利用对荧光检测、或者荧光与侧散射检测的结合将网织红细胞从成熟红细胞中区分开来; 以及

[0070] (f) 利用侧散射测定获得网织红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{网织})

[0071] 与上述血液样品的细胞血红蛋白检测方法相似, 检测血液样品中网织红细胞的细胞血红蛋白的方法优选进一步包括在仪器上进行检测前, 添加固定剂以固定细胞。

[0072] 核酸染色剂是水溶液, 其包含对RNA分子有特异性的荧光核酸染料、表面活性剂、和一种以上维持试剂渗透压的盐。优选地, 吡啶橙用于核酸染料中, 如实施例5所示。所述表面活性剂使得细胞膜可以渗透过小分子染料。实施例4中所示的球形化试剂包括n-十二烷

基-β-D-麦芽糖苷。正如专利号为6,271,035的美国专利所教导的,该表面活性剂用于促进细胞内的核酸快速染色,在此将其全部内容并入本文以供参考。实施例4中的球形化试剂致使细胞膜对于荧光染料分子而言可以充分渗透,但是不能渗透大生物分子例如抗体。该试剂用作核酸染料试剂的介质。优选地,该核酸染料试剂本质上为中性或弱碱性。它含有有机缓冲液,例如低浓度的HEPES。研究发现,应避免磷酸盐用于核酸染料试剂,因为它会干扰渗透剂的反应。此外,可选择地,该核酸染料试剂可进一步包含低浓度的固定化剂和糖类例如甲醛和D(+)-海藻糖,用以保护细胞。

[0073] 优选地,血液样本用核酸染料试剂稀释约50倍。血液样本与核酸染料试剂一起孵育的第一段时间典型地为30秒至约3分钟,优选约1分钟。RNAs染色后,将一等分染色液与渗透剂混合,优选渗透剂与染色样品的混和比例为约15:1-100:1。在进一步加入中和剂和固定剂后,在一个典型的实施方式中,血液样品的总稀释倍数为约4000倍。第一和第二样品混合物的孵育时间,特别是分别加入渗透剂和中和剂后,在所述的血液样品的细胞血红蛋白(Hgb_{细胞})测定方法中有描述。

[0074] 应理解,为了将网织红细胞内的RNAs染色,可以将核酸染色剂加入渗透剂或中和剂中,而不用采用如前所述的预染色步骤。但是,在与渗透剂和染色剂反应之前采用预染色步骤,在诊断分析中有实际优势。由于只有少量的染色样品用于本发明试剂系统的进一步处理,在最终的混合样品中染料的浓度非常低,这就提高了在荧光测量中信号与背景的比例,并防止了染料与试管和其它仪器器件的非特异性结合。

[0075] 实施例8显示了同时测定网织红细胞和网织红细胞细胞血红蛋白的测试实施例。血液样品首先与含有吖啶橙的核酸染色剂混合以将核酸染色,随后用渗透试剂、中和试剂和固定剂处理。制备的样品混合物在FC500MPL流式细胞仪上进行分析。获得的侧散射对FL1的散点图如图4A所示。FL1为在488nm处测得的荧光信号,源自网织红细胞中染色的RNAs。

[0076] 如图4A所示,与成熟红细胞相比,网织红细胞有明显更强的荧光信号。在该散点图中,一群网织红细胞位于成熟红细胞的右方。通过使用FL1柱状图或利用侧散射对FL1的二维散点图,都能将网织红细胞从成熟红细胞中分选出来。作为对照,未处理的血样品的散点图显示在图4B中,其中没有网织红细胞从成熟红细胞中分选出来。

[0077] 对图4A显示的散点图进行差异分析,将网织红细胞从成熟红细胞中分选出来。单个网织红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{网织})可以从单个网织红细胞的侧散射信号中得出,方法与前述用于样品混合液中所有红细胞的方法相同。

[0078] 另一方面,本发明提供了一种确定血液样品中血红蛋白变体的细胞百分率的方法。在一个实施方式中,该方法包括下述步骤:

[0079] (a) 将一等分血液样本与渗透试剂混合以形成第一样品混合物;并且将第一样品混合物孵育足以渗透血红细胞的细胞膜并且引起细胞内的血红蛋白聚集的第一段时间;

[0080] (b) 向第一样品混合物中加入中和试剂以形成第二样品混合物,其中中和试剂含有对所研究的血红蛋白变体有特异性的抗体;将第二样品混合物孵育足以使抗体与细胞内的血红蛋白变体结合、并且抑制渗透剂与血红细胞的进一步反应的第二段时间;

[0081] (c) 在流式细胞仪上,对第二样品混合物中的血红细胞的侧散射信号和指定波长下的荧光信号进行逐个细胞测定;

[0082] (d) 利用获得的荧光和侧散射信号,得到血红细胞的细胞血红蛋白变体(Hgb_{变体})和

细胞血红蛋白 (Hgb_{细胞}) ;

[0083] 以及 (e) 利用得到的Hgb_{变体}和Hgb_{细胞},得出红细胞变体的细胞百分率。

[0084] 类似地,可以在流式细胞仪测定之前,向样品混合液中加入固定试剂。此处,术语“血红蛋白变体”包括所有血红蛋白变体,例如胎儿血红蛋白、糖基化血红蛋白(HbA_{1c})、和异常形式的血红蛋白例如在镰刀形细胞疾病和地中海疾病中发现的血红蛋白。术语“细胞血红蛋白变体(Hgb_{变体})”是指在单个的红细胞中血红蛋白变体的量。术语“血红蛋白变体的细胞百分率”是指在单个的红细胞中特定血红蛋白变体在总血红蛋白中所占的百分率。利用以上定义的术语,血红蛋白变体的细胞百分率就等于Hgb_{变体}和Hgb_{细胞}的比率再乘以因子100。

[0085] 如上所述,可以将对血红蛋白变体有特异性的抗体加入中和试剂中。与中和试剂反应时,细胞膜变得对这些大抗体分子而言也具有透过性。抗体穿透细胞膜并与细胞内蛋白的抗原位点相结合。在测定HbA_{1c}的方法中,采用了荧光单克隆抗HbA_{1c}抗体。此处,术语“荧光抗体”是指共价结合荧光染料的抗体。

[0086] 在一个实施方式中,荧光单克隆抗HbA_{1c}抗体是抗HbA_{1c}-FITC抗体,它具有与抗HbA_{1c}抗体共价结合的荧光素N-异硫氰酸(FITC)。FITC在525nm处有最大吸收。在另一个实施方式中,荧光抗HbA_{1c}抗体为抗HbA_{1c}-Alexa Fluor 647抗体,通过将荧光染料Alexa Fluor 647共价结合于抗体上而制得。Alexa Fluor 647在647nm处有最大吸收。

[0087] 第一和第二样品混合物的孵育时间,特别是加入渗透试剂和中和试剂后,分别在前述的测量血液样品的细胞血红蛋白(Hgb_{细胞})的方法中进行过描述。

[0088] 实施例9显示了利用抗HbA_{1c}-Alexa Fluor 647抗体测定网织红细胞和成熟红细胞中HbA_{1c}的例子。但是,可以理解,相同的方法也可以用于测量所有红细胞的HbA_{1c},而不需要RNAs染色的步骤。在检测所有红细胞中的HbA_{1c}时,不需要将网织红细胞从红细胞中分选出来。

[0089] 在流式细胞仪上,通常需要一个参比对照来校准仪器。所述参比对照典型地由具有已知浓度的血红蛋白、或等量浓度的血红蛋白、已知侧散射和荧光强度的荧光粒子组成。它们典型地包括,但不仅限于:合成微粒、人或动物血细胞、以及加工过的人或动物血细胞。经过校正,细胞内HbA_{1c}的定量测定,即,在单个血细胞内的血红蛋白的绝对量可以在流式细胞仪上获得。

[0090] 在另一方面,本发明提供了一种测定血液样品中网织红细胞的细胞血红蛋白变体的方法。术语“细胞内网织红细胞的血红蛋白变体(Hgb_{变体-网织})”指单个网织红细胞中红细胞变体的量。

[0091] 在一个实施方式中,测定细胞内网织红细胞的血红蛋白变体的方法包含以下步骤:(a) 将一等分血液样品与核酸染料混合以形成染色样品,并且将染色样品孵育足以使染料结合细胞内RNAs的时间;(b) 将一等分染色样品与中和试剂混合,以形成第一样品混合物;将第一样品混合物孵育足以使渗透试剂透过成熟红细胞和网织红细胞的细胞膜、并引起细胞内红细胞的聚集的时间;(c) 向第一样品混合物中加入含有对所研究的血红蛋白变体有特异性的荧光抗体的中和试剂,以形成第二样品混合物;将第二样品混合物孵育足以使抗体与细胞内的血红蛋白变体结合、并抑制渗透试剂与成熟红细胞和网织红细胞的进一步反应的时间;(d) 在流式细胞仪上,对第二样品混合物中的成熟红细胞和网织红细

胞的在预定的波长下的荧光信号进行逐个细胞测定；和 (e) 将网织红细胞从成熟红细胞中分选出来，并利用荧光信号获得每个网织红细胞中细胞血红蛋白变体 (Hgb_{变体-网织})。

[0092] 加入每种试剂后的孵育时间如前所述。

[0093] 通过上述描述，可以理解，该方法可以进一步包括在步骤 (d) 中对第二样品混合物中的红细胞的侧散射信号进行逐个细胞测试。分选网织红细胞时，利用侧散射信号可以得到每个网织红细胞的细胞血红蛋白 (Hgb_{网织})。然后利用Hgb_{网织}和Hgb_{变体-网织}，就可以得出在每个网织红细胞中血红蛋白变体的细胞百分率。

[0094] 实施例9显示了测量血液样品中网织红细胞和成熟红细胞的HbA_{1c}和细胞血红蛋白的例子。血液样品首先与含有吡啶橙的核酸染色剂混合，将核酸染色，随后用渗透试剂处理。然后加入含有抗HbA_{1c}-Alexa Flour 647抗体的中和试剂，孵育样品混合物以允许抗体与HbA_{1c}结合。进一步加入固定剂以固定红细胞。将制备的样品混合物吸入FC500 MP1流式细胞仪，并在488nm (FL1) 和647nm (FL4) 处对侧散射信号和荧光信号进行逐个细胞测定。所得侧散射对FL1以及FL1对FL4散点图分别显示在图5A和5B中。

[0095] 利用侧散射比对FL1的散点图进行差异分析，可以将网织红细胞从成熟红细胞中区分开。如上所述，利用侧散射信号可以获得网织红细胞的细胞血红蛋白 (Hgb_{网织}) 和成熟红细胞的细胞血红蛋白 (Hgb_{细胞})。

[0096] 正如图5B所示，在此散点图中也将网织红细胞从成熟红细胞中分选出来。单个网织红细胞或单个成熟红细胞的HbA_{1c}通过使用该细胞的FL4信号测量出来。利用参比对照，例如标记了相同染料的荧光微球或细胞，可以得到网织红细胞的细胞糖基化血红蛋白 (HbA_{1c-网织}) 和成熟红细胞的细胞糖基化血红蛋白 (HbA_{1c})。从HbA_{1c-网织}和Hgb_{网织}的比率可以得出单个网织红细胞中的HbA_{1c}百分率。类似地，从成熟红细胞的HbA_{1c-网织}和细胞血红蛋白的比率可以得出单个成熟红细胞中的HbA_{1c}百分率。

[0097] 下述实施例为本发明的例证，但如同在权利要求中所述，决非表示限制本发明的范围。可以理解，当然，与下述的公开一致的各种其它的成分和比例都可以使用。实施例1：渗透剂组合物 组合物A

[0098] 制备下述渗透剂组合物

组分	浓度
N-月桂酰肌氨酸	2.3 mM
吡咯烷和 HCl	校正 pH 到 5.3 的量

[0099] 更具体来说，首先配制N-月桂酰肌氨酸存储液。将1.0gN-月桂酰肌氨酸 (Fluka) 预溶在1.5ml乙醇 (96%) 中。将180μl吡咯烷 (Aldrich) 加入95ml去离子水中。然后将N-月桂酰肌氨酸/乙醇溶液加入吡咯烷溶液；用吡咯烷和HCl将pH校正到5.6，用去离子水将体积校正为100ml，形成存储液。用去离子水将试剂总体积校正为100ml。取6.25ml存储液，用去离子水稀释至100ml，用吡咯烷和HCl调节pH到5.3，形成渗透剂组合物。试剂用无菌的孔径为0.22μm的尼龙滤膜过滤。组合物A的电导率为0.1mS/cm。组合物B

[0100] 制备下述渗透剂组合物：

组分	浓度
N-月桂酰肌氨酸	2.3 mM
胎牛血清蛋白	1.1 g/L
甘油	1.08 M
吡咯烷和 HCl	校正 pH 到 5.3 的量

[0101] 试剂组合物电导率为0.25mS/cm。如上所述,N-月桂酰肌氨酸以存储液形式加入。

组合物C

[0102] 制备下列渗透剂组合物:

组分	浓度
N-月桂酰肌氨酸	2.2 mM
Tris 月桂醇硫酸盐	0.5 mM
琥珀酸	4 mM
硼酸	40 mM
D(+)-葡萄糖	166 mM
吡咯烷和 HCl	校正 pH 到 5.0 的量

[0103] 试剂组合物电导率为0.5mS/cm。同上所述,N-月桂酰肌氨酸以存储液形式加入。

组合物D

[0104] 根据下述配方制备渗透剂

组分	浓度
N-月桂酰肌氨酸	2.03 mM
琥珀酸	10 mM
蔗糖	0.22 M
胎牛血清蛋白	0.015 mM
Proclin 300	0.5 mL/L
吡咯烷和 HCl	校正 pH 到 5.4 的量

[0105] 更具体的说,首先将蔗糖、proclin-300、琥珀酸、和1.2ml吡咯烷与900ml去离子水混合。加入N-月桂酰肌氨酸,搅拌,至N-月桂酰肌氨酸完全溶解。然后加入、溶解胎牛血清蛋白。校正体积为终体积(1升)的约99%,用稀释的吡咯烷(10% v/v)校正pH至5.4。pH校正可以用1M盐酸。校正试剂体积至1L,并用无菌的孔径为0.22 μ m的尼龙滤膜过滤。试剂电导率为0.99mS/cm,渗透压为268mOsm/Kg H₂O。Proclin 300购自加利福尼亚,南旧金山,Zymed实验室。实施例2:中和试剂组合物

[0106] 根据以下配方制备中和试剂水溶液:

组分	浓度
HEPES	40 mM
氯化钠	0.5 M
胎牛血清蛋白	0.91 mM
叠氮化钠	0.03 M
氢氧化钠	校正 pH 到 7.25 的量

[0107] 更具体来讲,首先将HEPES、氯化钠和胎牛血清蛋白溶解在去离子水中。将试剂体积校正为终体积的约60%。加入1M氢氧化钠校正pH至7.0。加入叠氮化钠,将试剂体积校正为终体积的约95%,用1M氢氧化钠进一步校正pH至7.25。校正试剂体积至终体积,并用无菌的孔径为0.22 μ m的尼龙滤膜过滤。试剂渗透压为1,095mOsm/Kg H₂O。实施例3:固定剂组合物

[0108] 根据以下配方制备固定剂水溶液:

组分	浓度
氯化钠	155 mM
二水合磷酸氢二钠	40 mM
甲醛	0.62 M
硼酸	180 mM
EGTA	10 mM
硫酸葡聚糖(分子量 500.000)	0.016 μ M

[0109] 更具体来讲,将组分溶解在约终体积90%的去离子水中。用1M氢氧化钠或1M盐酸校正pH至7.1。校正试剂体积至终体积,并用无菌的孔径为0.22 μ m的尼龙滤膜过滤。试剂渗透压为1,348mOsm/Kg H₂O。实施例4:球形化试剂组合物

[0110] 根据以下配方制备球形化试剂水溶液:

组分	浓度
氯化钠	0.137 M
HEPES	0.005 M
D(+)-海藻糖	0.0005 M
甲醛	0.083 M
N-十二烷基- β -D-麦芽糖苷	0.04 mM
Proclin-300	0.5 mL/L
氢氧化钠	校正 pH 至 7.5 的量

[0111] 具体来讲,将除氢氧化钠外的组分溶解在的去离子水中。将试剂体积校正为终体积的约90%。用1M氢氧化钠校正pH。校正试剂体积至终体积,并用无菌的孔径为0.22 μ m的尼龙滤膜过滤。实施例5:核酸染色剂组合物

[0112] 将吡啶橙加入实施例4的球形化试剂中,形成核酸染色剂,其中吡啶橙浓度为0.5mg/L。核酸染色剂重新用无菌的孔径为0.22 μ m的尼龙滤膜过滤。实施例6:渗透试剂对红细胞不同组分的影响

[0113] 将一部分血样,用0.7mM乙二胺四乙酸(EDTA)作为抗凝血剂处理后,用于制备血液血清。另一部分EDTA处理后的血样用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,并用九倍体积的水稀释以获得细胞溶解物。细胞溶解物经过2000g下离心15min后,将溶解的细胞部分和细胞膜部分分离。将含有细胞膜部分的小球与一定体积的水混合,使后者含5%体积的溶解细胞部分。

[0114] 在将血清沉淀物、溶解的细胞部分、细胞膜部分、以及作为对照的胎牛血清蛋白与实施例1中的组合物C、以及下列改进的试剂混合后,对其进行监控:1.改进的试剂1:实施例1中组合物C不加表面活性剂(Tris月桂醇硫酸盐和N-月桂酰肌氨酸),pH为7.0。2.改进的试剂2:实施例1中组合物C不加表面活性剂(Tris月桂醇硫酸盐和N-月桂酰肌氨酸),pH为5.0。3.改进的试剂3:实施例1中组合物C,pH为7.0。4.渗透剂4:如实施例1中所述组合物C(pH为5.0)。

[0115] 样品混合物的产生:将2ml上述的特定试剂与下列四种组合物之一进行混合:-0.01ml血清(A),-0.01ml胎牛血清蛋白制品,浓度为15%(重量/体积)(B),-0.1ml溶解的细胞部分(C),和-0.1ml细胞膜部分(D)。

[0116] 为了确定样品混合物制备1小时后的蛋白质沉淀,于650nm处检测样品混合物的光密度,此波长下作为这些部分主要成分的血红蛋白没有吸收。

[0117] 图1显示了试剂对下述细胞组分沉淀物的影响:血清;15%(w/v)胎牛血清蛋白制品(PBS);溶解的细胞部分(细胞溶胶);以及细胞膜部分。上述相关细胞组分的条状图从左到右显示了分别采用改进试剂1到3和渗透剂4获得的结果。

[0118] 图1显示,只有如上所述含有表面活性剂并且pH在4-6之间的渗透剂4引起了蛋白的聚集和沉淀,胎牛血清蛋白(BSA)除外。实施例7:对血样中细胞血红蛋白的测定

[0119] 将4 μ l血液样品与200 μ l实施例4中的球形化试剂混合。孵育1分钟后,随即取3 μ l悬浮液与60 μ l实施例1中的渗透剂组合物D混合。孵育2.5分钟后,加入100 μ l实施例2中的中和试剂。再孵育10min,加入80 μ l实施例3中的固定剂。

[0120] 从16名不同的患者收集了16个全血样本。每个样品都取一等分,用上述的程序进行处理。形成的样品混合物在FC500MPL细胞仪上进行分析。图2A显示了其中一个血液样品的前散射对侧散射的散点图。显示的这些细胞中的主要种群为处理过的红细胞,并且对于每一个分析的血液样本,测定了该种群中细胞的平均侧散射值。应注意,在散点图中有少数种群由于细胞的聚集而产生了加倍。该种群的数量为检测的血细胞总量的约1%,并且在确定平均侧散射值时不将它们考虑在内。

[0121] 为了对比,用球形化试剂而不用本发明的试剂系统制备这16个样品中每一个的另一等分。4 μ l血液样品与200 μ l实施例4中的球形化试剂混合。孵育1分钟后,取3 μ l悬浮液与240 μ l磷酸盐缓冲液(PBS)混合形成球形化样品。在同一个FC500MPL细胞仪上分析该球形化样品。图2B显示了与图2A相同的血液样品的前散射对侧散射的散点图。

[0122] 如图所示,利用本发明的方法得到的血液样品的平均侧散射值实质上高于利用球形化试剂和PBS得到的结果。在这16个血液样品中,利用本发明方法得到的平均侧散射信号平均高了约4-5倍。

[0123] 还利用配有制造商提供的试剂的Sysmex XE 2100血细胞分析仪(日本,Kobe, Sysmex公司),在标准条件下对这16个血液样本进行了分析。由分析仪报告的红细胞因子指数得出每个样品的平均血球血红蛋白(MCH)。MCH(pg)是由溶解的血液样品的总血红蛋白浓

度(Hgb,g/dl)和血液样品的红细胞计数(RBC, 10^{12} 个/L)计算得出的。应注意,MCH也可以用阿摩尔(attomol)表达,其通过用皮克除以血红蛋白摩尔质量而计算得出。

[0124] 独立地分析了由样品的两个等分得出的平均侧散射值与在血细胞分析仪上得出的MCH之间的相关性。图3A和图3B显示了线型相关性分析的结果。如图3A所示,利用本发明的方法得到的平均侧散射值(标记为细胞计量SS)与MCH有很好的相关性,其相关系数(r^2)为0.9202。这表明利用本发明的方法测得到的侧散射信号是对血红细胞的细胞血红蛋白的直接测量。相反,如图3B所示,利用球形化试剂处理过的平均散射值与MCH的相关性很低,相关系数(r^2)为0.2812。实施例8:对血液样品中网织红细胞的细胞血红蛋白的测定

[0125] 将4 μ l全血样品与200 μ l实施例5中核酸染色试剂混合。孵育1分钟后,取3 μ l悬浮液,随即与60 μ l实施例1中的渗透剂组合物D混合。孵育2.5分钟后,加入100 μ l实施例2中的中和试剂。再孵育10分钟,加入80 μ l实施例3中的固定剂。

[0126] 得到的样品混合物在FC500MPL细胞仪上进行分析,进行侧散射测量和488nm处(FL1)的荧光测量。图4A显示了获得的散射对FL1的散点图。

[0127] 同样样品的另一等分用相同的程序处理,除了其中将核酸染色试剂用实施例4中的球形化试剂替代。得到的样品混合物在FC500MPL细胞仪上进行分析,进行侧散射测量和荧光测量。图4B显示了获得的散射对FL1的散点图。

[0128] 如图4A所示,网织红细胞有更强的荧光信号,并且有一簇网织红细胞位于成熟血红细胞的右侧。网织红细胞可以通过使用FL1的柱状图或者使用而维散点图从成熟血红细胞中区分开。相反,在图4B中,当使用未染色的样品时,没有网织红细胞从成熟血红细胞中分离出来。

[0129] 应注意,显示的散点图没有排除白细胞,它们显示在图4A散点图的右侧,并且显示在图4B中标记网织红细胞区域的右下象限。

[0130] 对图4A中的散点图进行差异分析,以便将网织红细胞从成熟红细胞中分选出来。单个网织红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{网织})由侧散射信号得出,方法与前述的实施例7相同。实施例9:测量血样中的HbA_{1c}和网织红细胞的细胞血红蛋白

[0131] 将4 μ l血样与200 μ l实施例5中的核酸染色试剂混合。孵育1分钟后,取3 μ l悬浮液与60 μ l实施例1中渗透试剂组合物D混合。孵育2.5分钟后,加入100 μ l含有荧光抗HbA_{1c}抗体的中和试剂。该中和试剂含有实施例2中的中和试剂以及5mg/L共价结合于荧光染料Alexa Flour 647的单克隆抗HbA_{1c}抗体。再孵育10分钟后,加入80 μ l实施例3中的固定剂,形成最终的样品混合物。

[0132] 最终的样品混合物在FC500MPL细胞仪上进行分析,进行侧散射测量和488nm(FL1)及647nm处(FL4)的荧光测量。图5A显示了获得的散射对FL1的散点图。通过对散点图的差异分析将网织红细胞从成熟红细胞中分选出来。如前面实施例7和实施例8所述,利用侧散射信号可以得出单个网织红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{网织})和单个成熟红细胞的细胞血红蛋白(Hgb_{细胞})。

[0133] 图5B显示了测量得到的FL1对FL4的散点图。如图所示。在该散点图中,网织红细胞也从成熟红细胞中分离出来。利用细胞的FL4信号测定出单个网织红细胞或单个成熟红细胞的HbA_{1c}。利用参比对照,例如标记了相同染料的细胞的荧光微粒和细胞,得到了网织红细胞的细胞糖基化血红蛋白(HbA_{1c-网织})和成熟红细胞的细胞糖基化血红蛋白(HbA_{1c})。由

Hb_{A1c}-网织和Hgb网织的比率得出单个网织红细胞中的Hb_{A1c}百分率。类似地,由成熟红细胞的Hb_{A1c}-网织和细胞血红蛋白的比率得出单个成熟红细胞的Hb_{A1c}百分率。

[0134] 所述抗Hb_{A1c}抗体通过用正常人血红蛋白免疫小鼠而产生。正常人血红蛋白含有约5%的糖基化血红蛋白Hb_{A1c}。抗体的特异性通过进行微球测试呈阳性反应而反应出来,该测试使用了人β-血红蛋白链的三个N-端残基即缬氨酸、亮氨酸和组氨酸的糖基化三肽。该抗体不与未糖基化的三肽反应。

[0135] 按照生产商说明书,以每5个染料分子一个抗体分子的比率,通过将荧光染料分子Alexa Flour 647与单克隆的抗-Hb_{A1c}抗体共价结合而制得荧光抗Hb_{A1c}抗体。Alexa Flour647由位于加利福尼亚州Carlsbad市的Invitrogen公司生产。该染料在647nm处有最大吸收。

[0136] 虽然本发明进行了详细描述,并附图展示,但不能认为本发明仅限于该范围,而是列举了其中优选的示例性实施方式。显然,在由上述说明书和随附的权利要求书及其法律等价要求所描述的本发明的精神和范围内,可以进行做出各种修饰和改变。

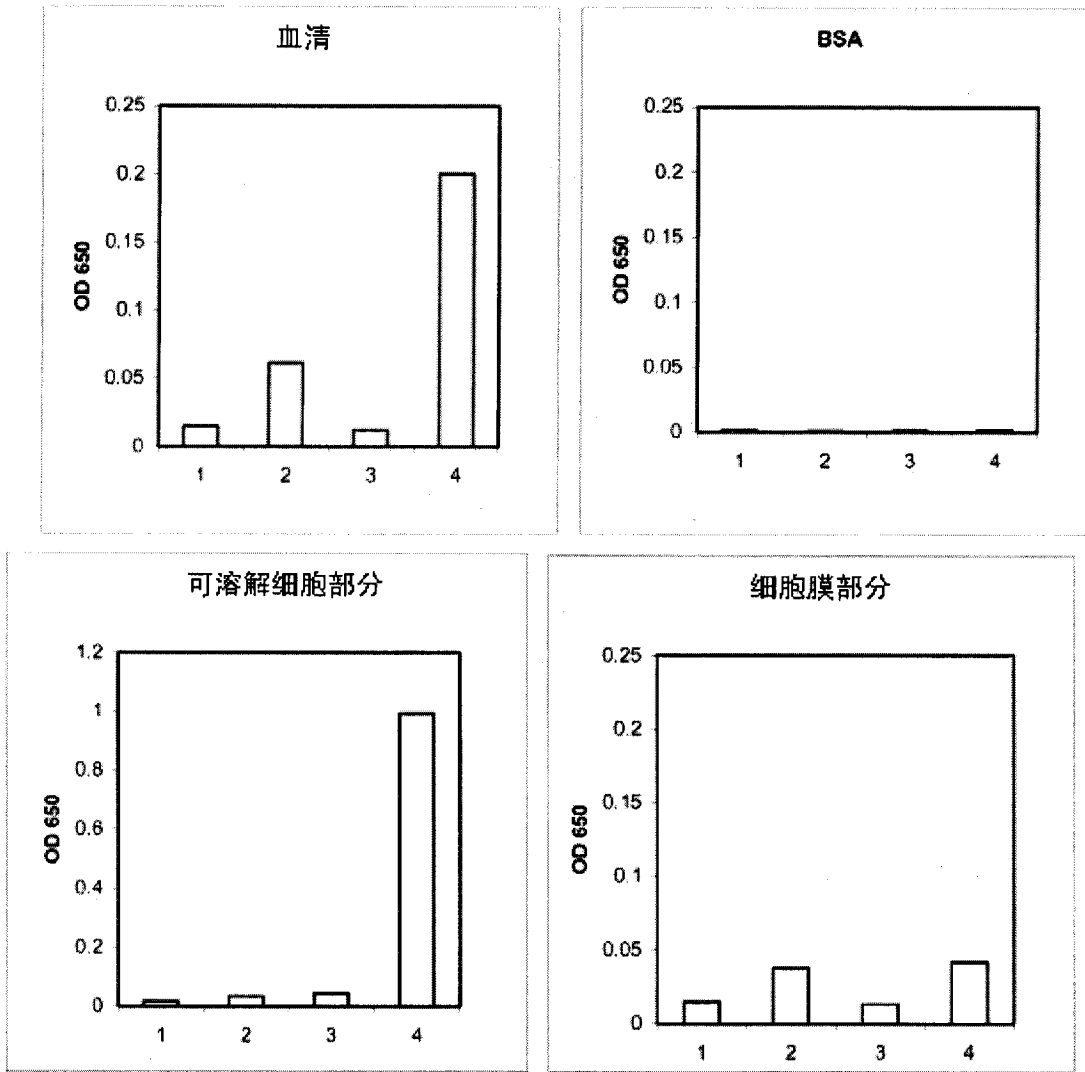


图1

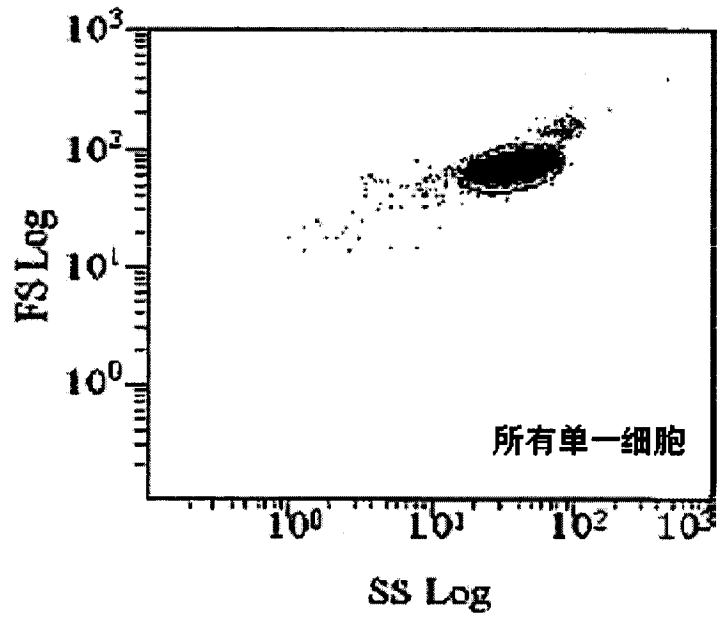


图2A

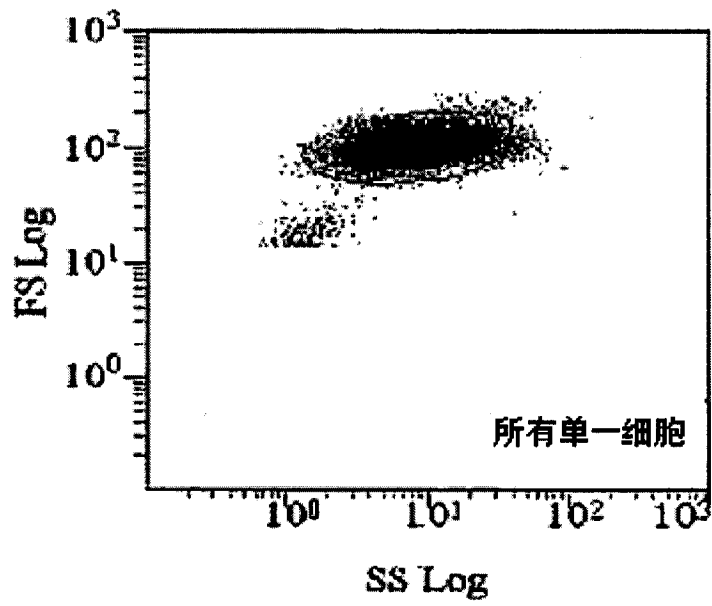


图2B

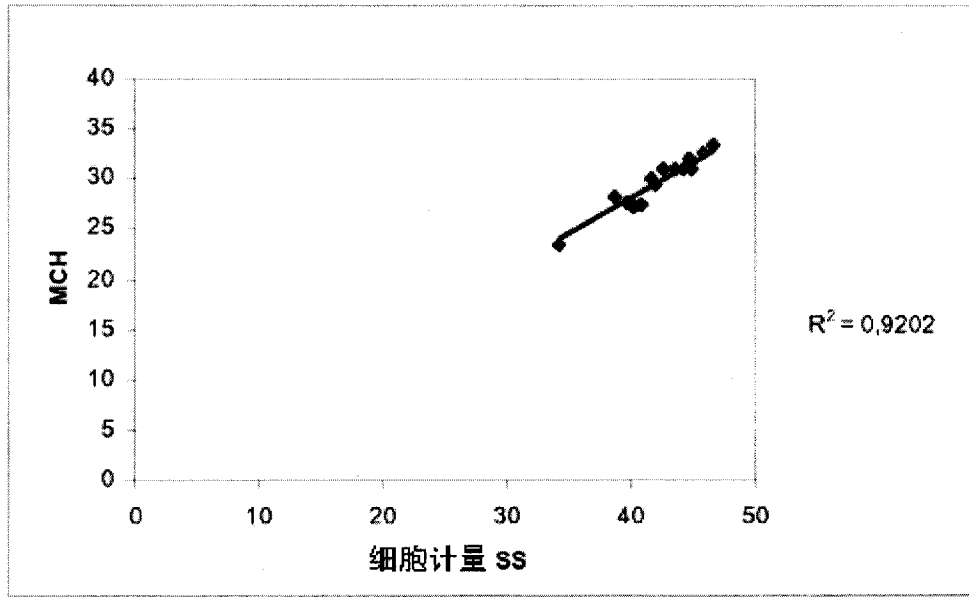


图3A

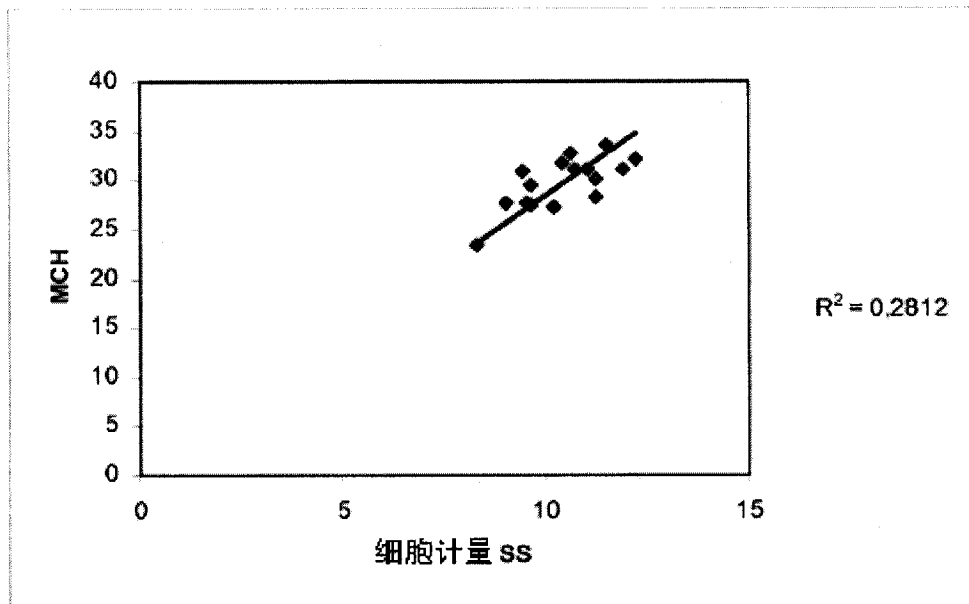


图3B

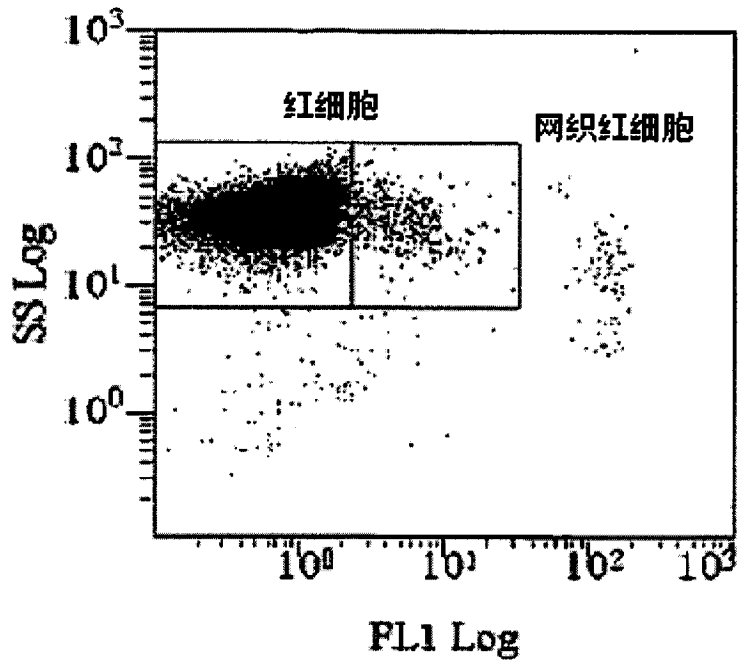


图4A

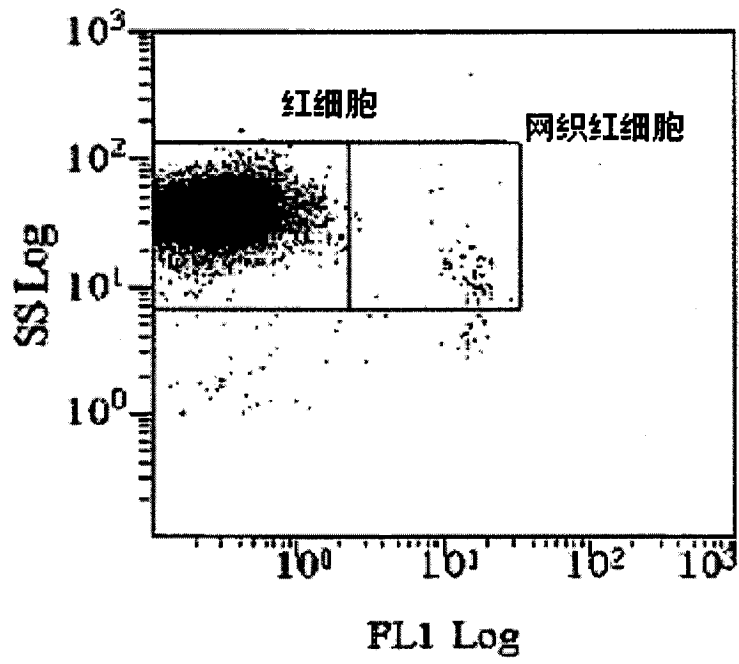


图4B

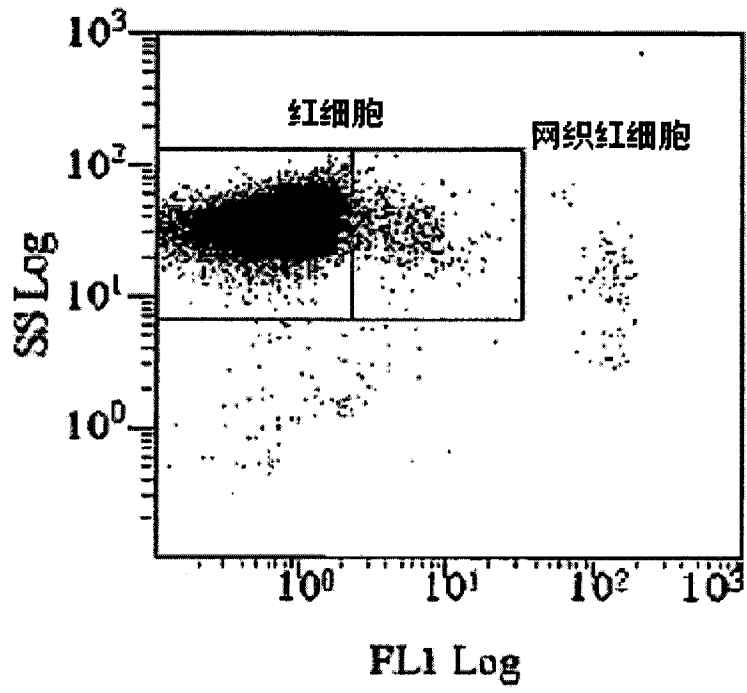


图5A

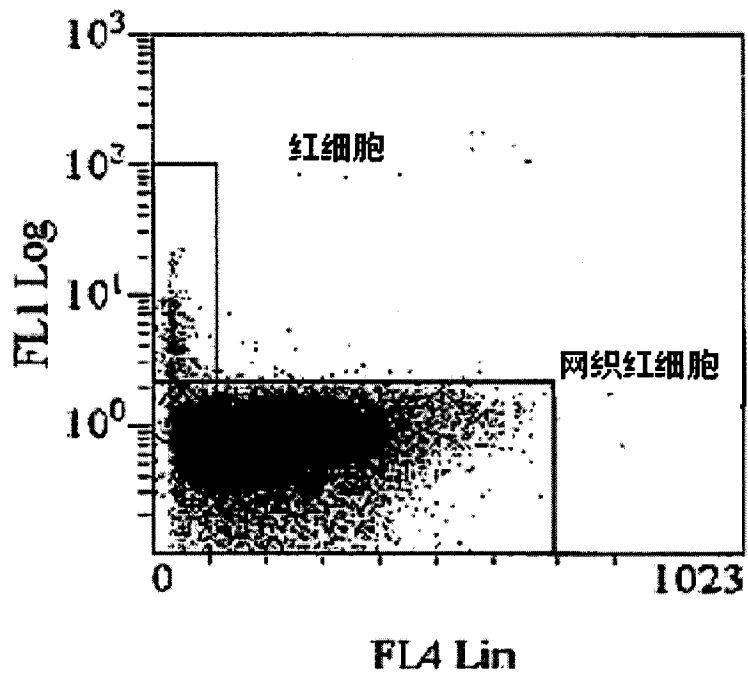


图5B

专利名称(译)	细胞血红蛋白的测试方法		
公开(公告)号	CN101501497B	公开(公告)日	2017-06-09
申请号	CN200780029610.2	申请日	2007-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	贝克曼考尔特公司		
申请(专利权)人(译)	贝克曼考尔特公司		
当前申请(专利权)人(译)	贝克曼考尔特公司		
[标]发明人	安德烈亚斯范阿格托万 法布里斯马莱格		
发明人	安德烈亚斯·范阿格托万 法布里斯·马莱格		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/726 G01N2015/0076		
代理人(译)	涂勇		
审查员(译)	杨光		
优先权	11/501395 2006-08-09 US		
其他公开文献	CN101501497A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测血液样本中细胞血红蛋白的方法，包括：将血液样本与渗透剂混合，并且孵育样品混合物以渗透红细胞的细胞膜并引起细胞内血红蛋白的聚集；添加中和剂以抑制渗透剂的进一步反应；在流式细胞仪上对样品混合物中的血红细胞的侧散射信号进行逐个细胞测定；以及利用获得的侧散射信号得出每一个血红细胞的细胞血红蛋白(Hgb细胞)。该方法进一步包括：利用同步荧光测试法分选网织红细胞，以测定网织红细胞的细胞血红蛋白(Hgb网织)。该方法还包括：通过向中和试剂中加入荧光抗体，并且探测结合于抗体的血红蛋白变体的荧光信号，测定成熟红细胞或网织红细胞中血红蛋白变体的细胞百分率。

组分

浓度

N-月桂酰肌氨酸

23 mM

吡啶和 HCl

校正 pH 到 5.3 的量