



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110579595 A

(43)申请公布日 2019.12.17

(21)申请号 201910850740.7

(22)申请日 2019.09.10

(71)申请人 核工业总医院

地址 215004 江苏省苏州市十梓街1号苏州
大学本部常悦楼208室

(72)发明人 俞秋兴

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

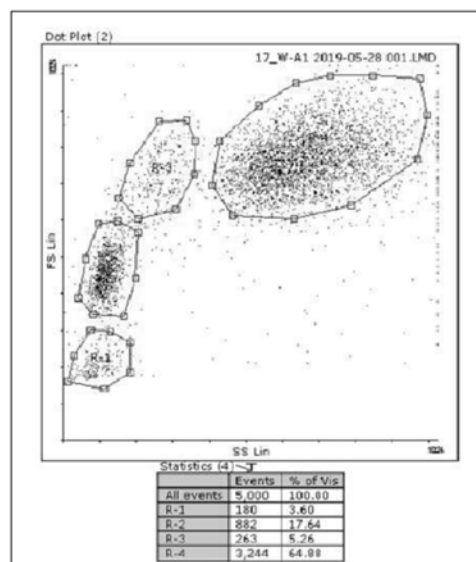
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种等张溶血素及其制备方法、处理生物样本方法和检测白细胞膜抗原方法

(57)摘要

本等张溶血素,包括氧化溶解剂、助溶剂、细胞增溶剂、细胞固定剂、无机盐及水质,氧化溶解剂为亚硝酸钠,且含量为2-20g/L;助溶剂为甘油、二甘醇、丙二醇中的一种或多种,且含量为0.3-3mmol/L;细胞增溶剂为异丁醇、甲醇、乙醇中的一种或多种,且含量为0.1-1mol/L;细胞固定剂为多聚甲醛、甲醛、乙醇、丙酮的一种或多种,且含量为10-40g/L;无机盐为氯化钠、氯化镁和氯化钙,且所述氯化钠的含量为1-10g/L,氯化镁的含量为1-100mmol/L,氯化钙的含量为1-100mmol/L。同时提出了该溶血素制备方法、溶血素处理生物样本方法和通过流式细胞仪检测白细胞膜抗原方法,该溶血素处理样本后白细胞各群体分区明显,不损伤白细胞膜蛋白,既保留原有的生物学活性,又能完全裂解红细胞,结果准确、性能稳定。



1. 一种等张溶血素, 其特征在于, 包括氧化溶解剂、助溶剂、细胞增溶剂、细胞固定剂、无机盐及水质, 所述氧化溶解剂为亚硝酸钠, 且所述氧化溶解剂含量为2-20g/L; 所述助溶剂为甘油、二甘醇、丙二醇中的一种或多种, 且其含量为0.3-3mmol/L; 所述细胞增溶剂为异丁醇、甲醇、乙醇中的一种或多种, 且其含量为0.1-1mol/L; 所述细胞固定剂为多聚甲醛、甲醛、乙醇、丙酮的一种或多种, 且其含量为10-40g/L; 所述无机盐为氯化钠、氯化镁和氯化钙, 且所述氯化钠的含量为1-10g/L, 氯化镁的含量为1-100mmol/L, 氯化钙的含量为1-100mmol/L。

2. 根据权利要求1所述的一种等张溶血素, 其特征在于, 所述溶血素还含有微量的稳定剂和防腐剂。

3. 根据权利要求2所述的一种等张溶血素, 其特征在于, 所述溶血素中还含有PH值调节剂, 所述PH值调节剂为碳酸氢钠, 且碳酸氢钠的含量为0.1-1mmol/L。

4. 如权利要求1-3所述的等张溶血素的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 按上述含量取亚硝酸钠、氯化钠、氯化钙、氯化镁加入水介质充分溶解后得混合液。

2) 在步骤1) 得到的混合缓冲液中加入甲醛、甘油、异丁醇溶液, 加入水介质至1升, 碳酸氢钠调PH值7.4-7.6, 再经过滤, 得溶血素。

5. 如权利要求1-3所述的等张溶血素的处理生物样本的方法, 其特征在于, 在室温条件下向生物样本中加入所述的溶血素, 混合处理10-15分钟; 所述生物样本为抗凝剂静脉全血的; 所述溶血素与生物样本的体积比为1:40-3:40。

6. 如权利要求1-3所述的等张溶血素通过流式细胞仪检测白细胞膜抗原的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 在室温条件下向待测样本中加入检测细胞表面分子的荧光标记抗体, 混匀, 避光孵育10-15min;

2) 加入所述的等张溶血素, 混合处理, 避光孵育10min;

3) 将处理后的待测样本用离心机以300-500g的离心速度沉淀样本5-10min;

4) 将离心处理后的样本去上清液后, 加入PBS缓冲液, 混匀样本, 待测;

5) 待测样本经流式细胞仪分析, 按细胞体积大小和颗粒度依次分为淋巴细胞群、单核细胞群、中性粒细胞群。

一种等张溶血素及其制备方法、处理生物样本方法和检测白细胞膜抗原方法

技术领域

[0001] 本发明免疫学细胞分析涉及领域,具体涉及一种等张溶血素及其制备方法、处理生物样本方法和检测白细胞膜抗原方法。

背景技术

[0002] 血细胞分析对于开展科学研究,疾病的预防、诊断和治疗有着重要的价值,从最初研究细胞的形态、大小、数量到最近的细胞表面的抗原成分。传统的细胞免疫和非特异性免疫功能检测技术不能从单细胞水平对靶细胞的大小、形态、质膜和细胞内部结构进行多参数,高灵敏度的分析,流式细胞仪可以快速测量、分选、存贮、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量,并可以根据预选的参量范围把指定的细胞亚群从中分选出来,目前应用于免疫学、血液学、肿瘤学、细胞遗传学、细胞生物学、生物化学等临床医学和基础医学研究领域,如细胞表面分子的淋巴细胞及其亚群分析、细胞内细胞因子分析、白血病免疫分型、肿瘤耐药相关蛋白分析、自身免疫性疾病相关HLA抗原分析、移植免疫中的交叉配型、线粒体膜电位、细胞凋亡、细胞内钙离子浓度、中性粒细胞功能分析等。

[0003] 由于体内发挥免疫功能的多数为白细胞,而人类血液中含有最多的是红细胞,为了减少对靶细胞分析影响,需要剔除血液中红细胞的干扰作用,在进行红细胞溶血时要避免破坏白细胞的结构和功能,保留白细胞表面的膜蛋白,因此,对溶血的要求非常着高,现有的流式细胞溶血素多为低渗溶血素,即低于渗透压的溶液,等渗液溶血素是与渗透压相等的溶液,以前认为红细胞在等渗溶液中,能保持其正常形态(不皱缩、不溶血),但有的分子还能够自由通过细胞膜,使红细胞溶血,它们都是利用细胞内外渗透压差异而导致细胞膜破裂,通过改变红细胞的物理结构实现溶血反应。一些化学物质如药物、细菌毒素、蛇毒等,与红细胞中的亚铁血红蛋白结合,变成高铁血红蛋白,使红细胞结构发生改变,导致溶血反应。

[0004] 溶血素的配方和仪器有一定的关系,不同的仪器使用不同的溶血素,同一溶血素在不同仪器上显示的效果不一,主因是溶血素裂解后的白细胞形态有差异,再结合FSC/SSC的光路设计会导致淋巴、单核、粒细胞分群的差异。目前市面上许多溶血素只适合某一类流式细胞仪,不能达到一种溶血素通用多类流式细胞仪的作用。

[0005] 因此,如何研发一种能够克服上述缺陷的等张溶血素及其制备方法、处理生物样本方法和检测白细胞膜抗原方法,是本领域有关人员亟待解决的技术问题。

发明内容

[0006] 为解决上述技术问题,我们提出了一种等张溶血素制备,本发明的溶血素能在红细胞结构发生改变的同时又不破坏白细胞的形态、结构和功能,其检测精确度高,干扰杂质少,能够替代进口同类产品的溶血素,减少医院医疗成本,减轻病人医疗费用。

[0007] 为达到上述目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 一种等张溶血素,包括氧化溶解剂、助溶剂、细胞增溶剂、细胞固定剂、无机盐及水质,所述氧化溶解剂为亚硝酸钠,且所述氧化溶解剂含量为2-20g/L,亚硝酸钠能氧化红细胞,使血液中的亚铁血红蛋白变成高铁血红蛋白,在助溶剂的帮助下能快速裂解红细胞,且碎片少;所述助溶剂为甘油、二甘醇、丙二醇中的一种或多种,且其含量为0.3-3mmol/L,可降低水的活性,防止降解保护可溶性的蛋白和白细胞,增加稳定性,防挥发;所述细胞增溶剂为异丁醇、甲醇、乙醇中的一种或多种,且其含量为0.1-1mol/L,对生物膜有很高的吸附和渗透能力,导致生物膜增溶和渗透性改变;所述细胞固定剂为多聚甲醛、甲醛、乙醇、丙酮的一种或多种,且其含量为10-40g/L,对大多数抗原保存较好,组织穿透性好,组织收缩较小;所述无机盐为氯化钠、氯化镁和氯化钙,且所述氯化钠的含量为1-10g/L,氯化镁的含量为1-100mmol/L,氯化钙的含量为1-100mmol/L,用于调节溶血素中的电导率和渗透压。

[0009] 优选的,所述溶血素还含有微量的稳定剂和防腐剂。

[0010] 优选的,所述溶血素中还含有PH值调节剂,所述PH值调节剂为碳酸氢钠,且碳酸氢钠的含量为0.1-1mmol/L。

[0011] 一种等张溶血素制备方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 按上述含量取亚硝酸钠、氯化钠、氯化钙、氯化镁加入水介质充分溶解后得混合液。

[0013] 2) 在步骤1)得到的混合缓冲液中加入甲醛、甘油、异丁醇溶液,加入水介质至1升,碳酸氢钠调PH值7.4-7.6,再经过滤,得溶血素。

[0014] 一种等张溶血素的处理生物样本的方法,在室温条件下向生物样本中加入所述的溶血素,混合处理10-15分钟;所述生物样本为抗凝剂静脉全血的;所述溶血素与生物样本的体积比为1:40-3:40。

[0015] 一种等张溶血素通过流式细胞仪检测白细胞膜抗原的方法,包括以下步骤:

[0016] 1) 在室温条件下向待测样本中加入检测细胞表面分子的荧光标记抗体,混匀,避光孵育10-15min;

[0017] 2) 加入所述的等张溶血素,混合处理,避光孵育10min;

[0018] 3) 将处理后的待测样本用离心机以300-500g的离心速度沉淀样本5-10min;

[0019] 4) 将离心处理后的样本去上清液后,加入PBS缓冲液,混匀样本,待测;

[0020] 5) 待测样本经流式细胞仪分析,按细胞体积大小和颗粒度依次分为淋巴细胞群、单核细胞群、中性粒细胞群。

[0021] 通过上述技术方案,本发明的溶血素是流式细胞分析检测白细胞抗原的常用辅助分析试剂之一,也是细胞免疫功能等分析的关键试剂,其根据细胞大小和颗粒度通过流式细胞仪上的前向角(SSC)和侧向角散射光(FSC)把白细胞群体分为淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞以及碎片,处理样本后白细胞各群体分区明显,细胞碎片少,不损伤白细胞膜蛋白,既能保留原有的生物学活性,又能完全裂解红细胞所述的溶血素,结果准确、性能稳定,能替代进口原装产品的溶血素,达到进口试剂国产化,降低科研和医疗成本,减轻病人医疗费用,检测精确度高,干扰杂质少,能够在COULTER系列、BD系列等主流分析仪上都有良好的分群图谱,且稳定性高,易于保存。本发明的溶血素比于其它溶血素在色泽上稍逊,溶血开始时颜色呈现褐色,能在溶血的同时又不破坏白细胞的形态、结构和功能

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0023] 图1为本发明实施例所公开的一种等张溶血素用于FC500流式细胞仪溶血效果图(一);

[0024] 图2为本发明实施例所公开的一种等张溶血素用于FC500流式细胞仪溶血效果图(二);

[0025] 图3为本发明实施例所公开的一种等张溶血素用于FC500流式细胞仪溶血效果图(三);

[0026] 图4为本发明实施例所公开的一种等张溶血素用于FC500流式细胞仪溶血效果图(四)。

具体实施方式

[0027] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,优选实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,所举实施例是为了更好地对本发明的内容进行说明,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0028] 下面结合实施例和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

[0029] 如图1、图2、图3和图4所示,一种等张溶血素,包括氧化溶解剂、助溶剂、细胞增溶剂、细胞固定剂、PH值调节剂、无机盐及水质,所述氧化溶解剂为亚硝酸钠,且氧化溶解剂含量为2-20g/L,亚硝酸钠能氧化红细胞,使血液中的亚铁血红蛋白变成高铁血红蛋白,在助溶剂的帮助下能快速裂解红细胞,且碎片少;所述助溶剂为甘油、二甘醇、丙二醇中的一种或多种,且其含量为0.3-3mmol/L,可降低水的活性,防止降解保护可溶性的蛋白和白细胞,增加稳定性,防挥发;所述细胞增溶剂为异丁醇、甲醇、乙醇中的一种或多种,且其含量为0.1-1mol/L,对生物膜有很高的吸附和渗透能力,导致生物膜增溶和渗透性改变;所述细胞固定剂为多聚甲醛、甲醛、乙醇、丙酮的一种或多种,且其含量为10-40g/L,对大多数抗原保存较好,组织穿透性好,组织收缩较小;所述PH值调节剂为碳酸氢钠,且碳酸氢钠的含量为0.1-1mmol/L;所述无机盐为氯化钠、氯化镁和氯化钙,且所述氯化钠的含量为1-10g/L,氯化镁的含量为1-100mmol/L,氯化钙的含量为1-100mmol/L,用于调节溶血素中的电导率和渗透压。所述溶血素还含有微量的稳定剂和防腐剂。

[0030] 在上述等张溶血素的基础上,本发明还公开了一种等张溶血素制备方法,包括以下步骤:

[0031] S1、按上述含量取亚硝酸钠、氯化钠、氯化钙、氯化镁加入水介质充分溶解后得混合液。

[0032] S2、在步骤S1得到的混合缓冲液中加入甲醛、甘油、异丁醇溶液,加入水介质至1升,碳酸氢钠调PH值7.4-7.6,再经过滤,得溶血素。

[0033] 用上述的等张溶血素的处理生物样本的方法如下：在室温条件下向生物样本中加入所述的溶血素，混合处理10-15分钟；所述生物样本为抗凝剂静脉全血的；所述溶血素与生物样本的体积比为1:40-3:40。

[0034] 同时，用上述的等张溶血素通过流式细胞仪检测白细胞膜抗原的方法，包括以下步骤：

[0035] S1、在室温条件下向待测样本中加入检测细胞表面分子的荧光标记抗体，混匀，避光孵育10-15min；

[0036] S2、加入所述的等张溶血素，混合处理，避光孵育10min；

[0037] S3、将处理后的待测样本用离心机以300-500g的离心速度沉淀样本5-10min；

[0038] S4、将离心处理后的样本去上清液后，加入PBS缓冲液，混匀样本，待测；

[0039] S5、待测样本经流式细胞仪分析，按细胞体积大小和颗粒度依次分为淋巴细胞群、单核细胞群、中性粒细胞群。

[0040] 实验对象和试剂：15份健康和亚健康人群的外周血样用EDTA、肝素、柠檬酸钠抗凝，室温（18~25℃）保存，8h以内完成检测。准确度评价采用Cytomics FC500流式细胞仪，其配套试剂为T淋巴亚群检测四色试剂CD45-PerCP-Cy5.5/CD4-FITC/CD8-APC/CD3-PE，配套溶血素OptiLyse C，精密度实验使用Beckman Coulter公司生产的Immuno-Trol cells质控血，4℃保存。

[0041] 实验方法：取10μl CD45-PerCP-Cy5.5/CD4-FITC/CD8-APC/CD3-PE抗体加入流式上样管中，再用反向加样法加入100μl血样标本，混匀后室温避光孵育10-15min；分别加自制溶血素和配套溶血素OptiLyse C 1000μl，震荡混匀后室温避光溶血10min；将处理后的待测样本用离心机以300-500g的离心速度沉淀样本5-10min；将离心处理后的样本去上清液后，加入PBS缓冲液，充分混匀后1h内完成上机检测。

[0042] 本发明的溶血素溶血后程度和效果如下：

[0043] a，溶血管外观：上清液清澈透亮，红细胞裂解充分；

[0044] b，离心后管底：溶血管经300g离心10分钟后，管底部无肉眼可见的红色沉淀物，红细胞碎片少。

[0045] c，FSC/SSC散点图：各系列细胞分群明显、界限清晰、细胞聚集度高、无交叉（见溶血效果图）。

[0046] d，细胞表面标记：对各系细胞膜表面CD抗原无明显影响（相关分析表）。

[0047] e，该款溶血素能通用于用于BD系列和COULTER系列等主流流式细胞仪。

[0048] 实施例：

[0049]

	实例一	实例二	实例三	单位	范围
甲醛	10	12	10	g/L	10-40
甘油	1	1.36	0.8	mol/L	0.3-3
亚硝酸钠	15	12	8	g/L	2-20
异丁醇	0.3	0.2	0.3	mol/L	0.1-1
氯化镁	6	10	5	mmol/L	1-100
氯化钙	10	5	5	mmol/L	1-100
氯化钠	8	7	9	g/L	1-10
碳酸氢钠	0.5	0.5	0.5	mmol/L	0.1-1

[0050] 准确度实验:

[0051] 为了测定结果中的不准确度,评价系统误差的大小,进行以下实验:选取15份健康和亚健康人群的抗凝外周血样,每份标本分别用两种溶血素各测定二次,记录实验结果,进行直线回归和相关性分析。表1自制溶血素和OptiLyse C溶血素检测T淋巴细胞亚群百分比结果的相关性分析(%)

[0052]

检测项目	例数	均数		P 值	线性回归		
		自制	OptiLyse C		R2	斜率	截距

[0053]

CD3+	15	72.7	72.3	0.01	0.990	0.989	0.71
CD3+CD4+	15	38.6	39.1	0.02	0.993	1.003	-0.19
CD3+CD8+	15	28.3	27.9	0.005	0.989	0.994	-0.03

[0054] 精密度实验:

[0055] 为了评价测定结果中的随机误差大小,进行下列实验:1,批内重复试验:使用Immuno-Trol cells质控血分别用两种溶血素在同一时间段内连续加样检测10次;2,批间重复试验:使用Immuno-Trol cells质控血在每天同一段时间分别用两种溶血素各加样检测一次,连续检测10天。

[0056] 自制溶血素和OptiLyse C溶血素测定T淋巴细胞亚群百分比的精密度结果(批内)

[0057]

次数	CD3+		CD3+CD4+		CD3+C D8+	
	发明	市售	发明	市售	发明	市售
1	67.11	69.33	39.22	41.51	24.28	25.47
2	66.46	68.87	38.85	41.84	24.41	24.97
3	67.35	68.09	39.55	42.52	24.33	25.18
4	66.78	68.01	39.54	40.73	24.69	24.83
5	68.08	69.59	39.68	41.95	25.08	25.89
6	66.41	68.34	38.53	41.51	24.63	25.45
7	67.40	68.23	39.16	41.59	24.44	25.32
8	67.23	69.14	39.33	41.53	24.99	25.72
9	66.39	68.91	38.56	40.94	24.58	25.22
10	66.81	69.04	39.07	41.81	24.66	25.68
均值	67.00	68.76	39.15	41.59	24.61	25.37
标准差	0.54	0.55	0.40	0.50	0.26	0.34
变异系数	0.80	0.80	1.03	1.21	1.08	1.33

[0058] 自制溶血素和OptiLyse C溶血素测定T淋巴细胞亚群百分比的精密度结果(批间)

[0059]

天数	CD3+		CD3+CD4+		CD3+CD8+	
	自制	市售	自制	市售	自制	市售
1	67.32	70.13	39.66	41.12	24.08	25.15
2	66.16	68.66	38.78	41.94	24.11	24.38
3	67.15	68.39	39.42	42.66	24.63	25.15
4	66.73	67.81	40.55	40.44	25.02	24.78
5	68.38	70.49	39.68	41.95	25.08	25.89
6	66.61	67.34	38.33	41.23	24.53	25.55
7	67.36	68.23	39.16	41.59	24.50	25.12
8	67.83	70.14	39.63	41.93	25.39	25.72
9	65.52	67.91	38.35	40.14	24.48	25.22
10	65.99	67.44	39.97	42.13	24.63	25.96
均值	66.91	68.65	39.35	41.51	24.65	25.29
标准偏差	0.88	1.18	0.71	0.78	0.42	0.50
变异系数	1.31	1.71	1.80	1.89	1.69	1.96

[0060] 以上所述的仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明创造构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

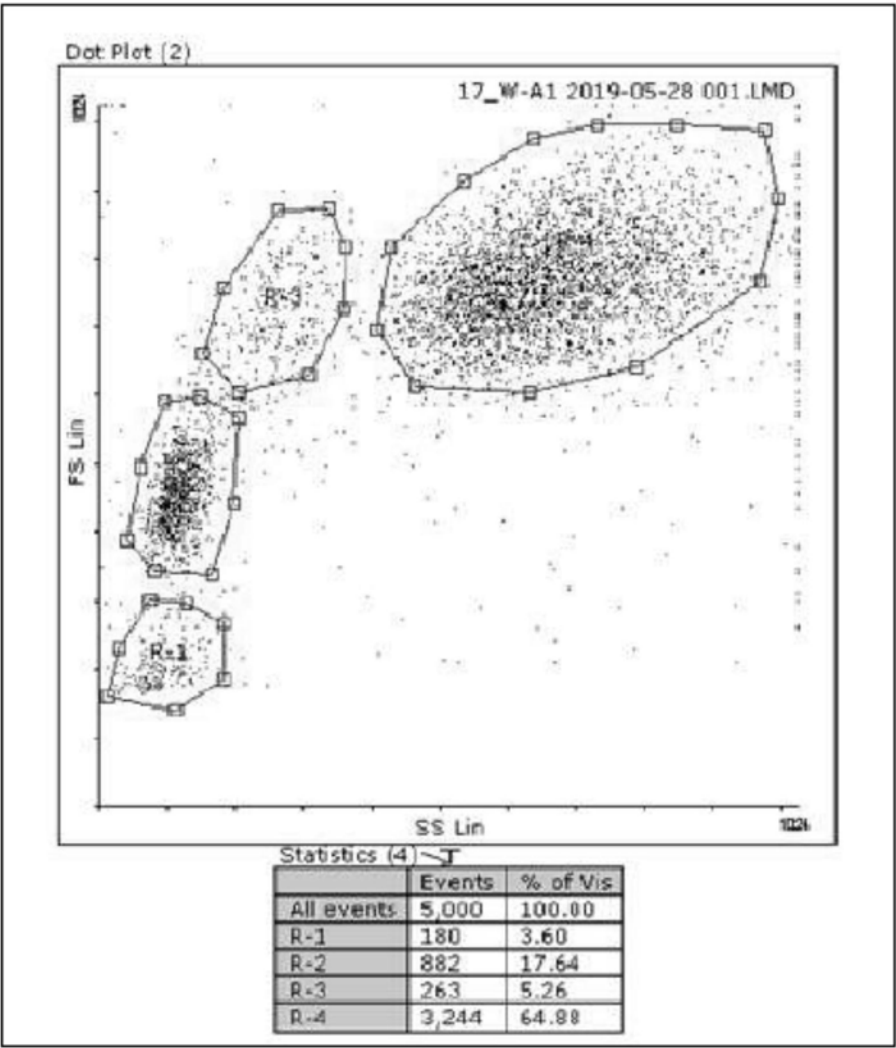


图1

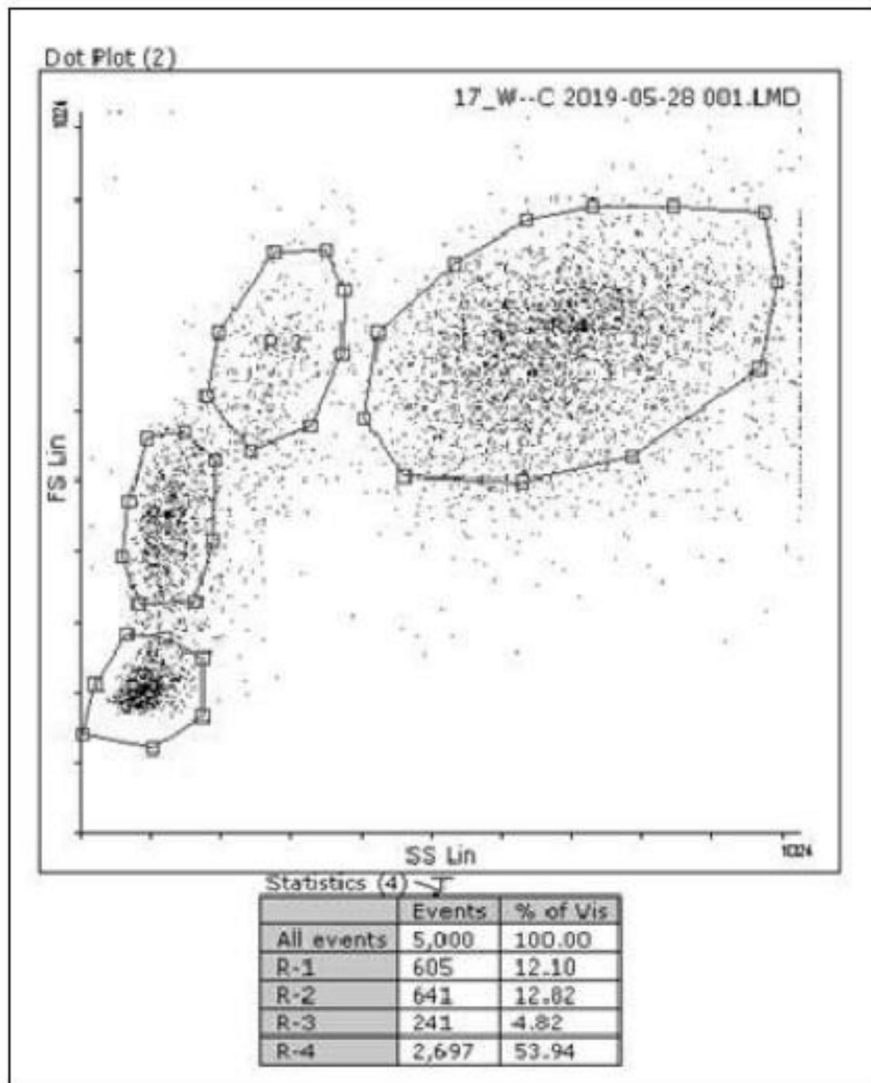


图2

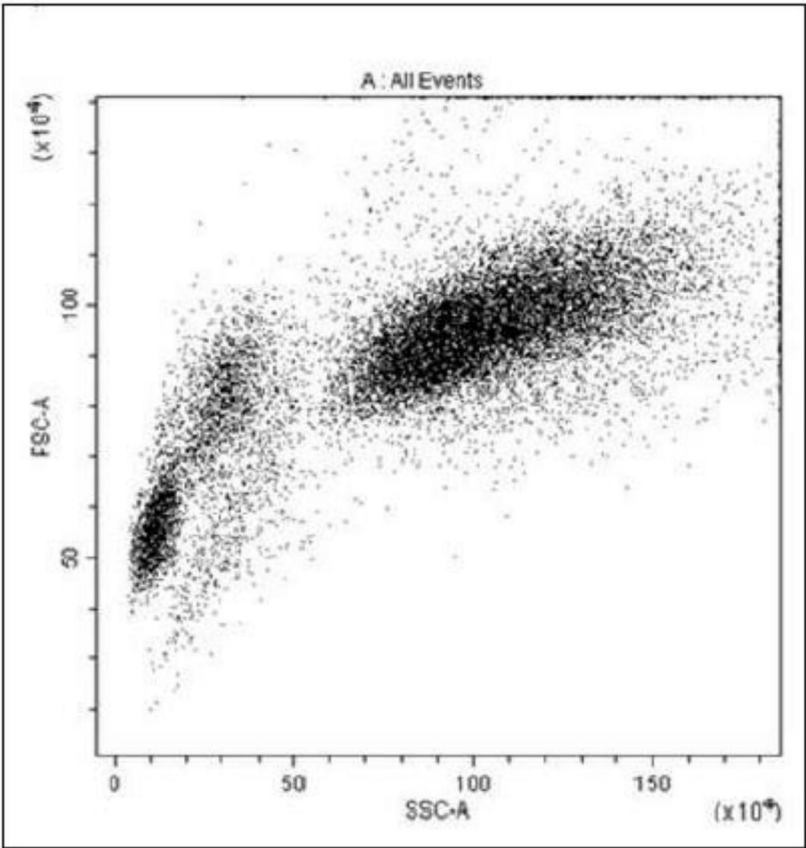


图3

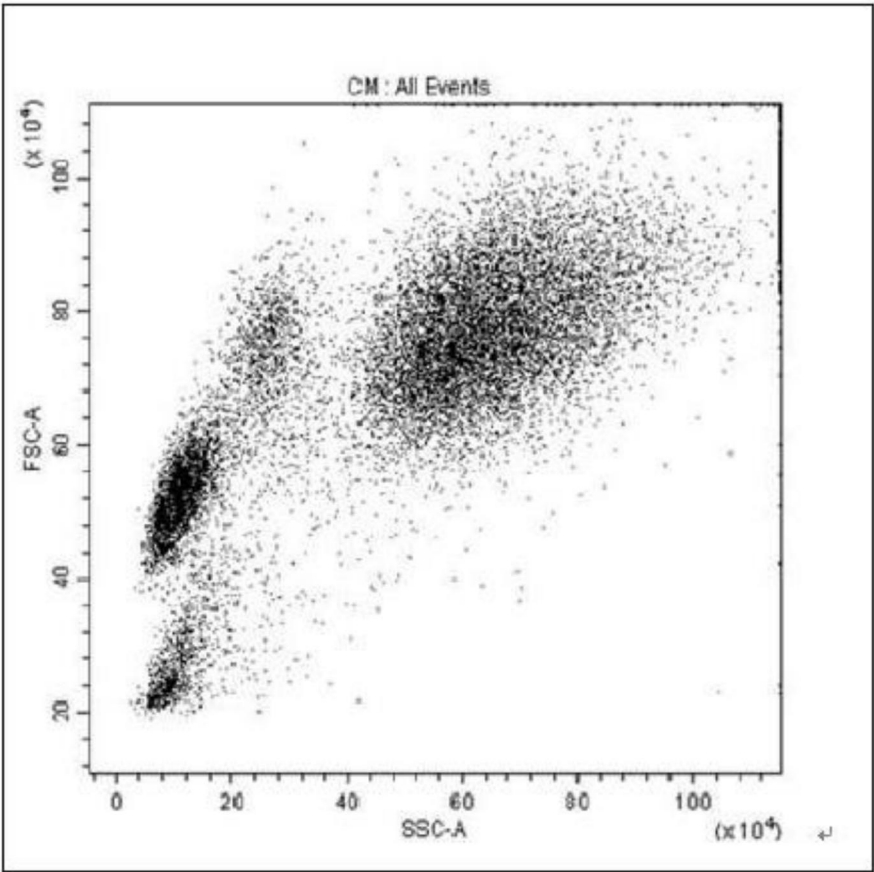


图4

专利名称(译)	一种等张溶血素及其制备方法、处理生物样本方法和检测白细胞膜抗原方法		
公开(公告)号	CN110579595A	公开(公告)日	2019-12-17
申请号	CN201910850740.7	申请日	2019-09-10
发明人	俞秋兴		
IPC分类号	G01N33/533 G01N15/14		
CPC分类号	G01N15/1404 G01N15/1434 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本等张溶血素，包括氧化溶解剂、助溶剂、细胞增溶剂、细胞固定剂、无机盐及水质，氧化溶解剂为亚硝酸钠，且含量为2-20g/L；助溶剂为甘油、二甘醇、丙二醇中的一种或多种，且含量为0.3-3mmol/L；细胞增溶剂为异丁醇、甲醇、乙醇中的一种或多种，且含量为0.1-1mol/L；细胞固定剂为多聚甲醛、甲醛、乙醇、丙酮的一种或多种，且含量为10-40g/L；无机盐为氯化钠、氯化镁和氯化钙，且所述氯化钠的含量为1-10g/L，氯化镁的含量为1-100mmol/L，氯化钙的含量为1-100mmol/L。同时提出了该溶血素制备方法、溶血素处理生物样本方法和通过流式细胞仪检测白细胞膜抗原方法，该溶血素处理样本后白细胞各群体分区明显，不损伤白细胞膜蛋白，既保留原有的生物学活性，又能完全裂解红细胞，结果准确、性能稳定。

